

Universitat de Lleida

# Rol de la glutatión-S-transferasa y del citocromo P450 en la resistencia metabólica a herbicidas en *Lolium rigidum* de cereales de invierno

Trabajo de Fin de Máster

Ana Oliver Flores

Tutor: Joel Torra Farré

Máster de Protección Integrada de Cultivos

Enero 2020



Escola  
Tècnica  
Superior  
d'Enginyeria  
Agrària

## RESUMEN

El vallico (*Lolium rigidum*) es la especie más propensa a desarrollar resistencias a herbicidas en todo el mundo. En España está considerada la mala hierba con mayor impacto negativo en los cereales de invierno. Esta especie puede desarrollar resistencia a todos los herbicidas disponibles, tanto por mecanismos ligados al sitio de acción como por mecanismos no ligados al sitio de acción. Entre los mecanismos no ligados al sitio de acción, el más preocupante es la capacidad aumentada de metabolizar los herbicidas (a diferencia de una planta sensible), porque es precisamente este mecanismo el que puede dar resistencia a varios herbicidas con diferentes modos de acción.

En España, ya hay poblaciones de *L. rigidum* en cereales de invierno que no son controladas con la mayoría de herbicidas del mercado, pero sus mecanismos de resistencia no ligados al sitio de acción aún no han sido estudiados. Además, disponer de herramientas de detección rápida de la presencia de metabolismo aumentado como mecanismo de resistencia, sería una información muy valiosa en la ayuda a la toma de decisiones para racionalizar el uso de los herbicidas, como marca la directiva europea.

Los objetivos de este trabajo fueron, mediante ensayos en invernadero, 1) confirmar la resistencia al herbicida prosulfocarb (grupo HRAC N) en dos poblaciones con resistencia múltiple a varios herbicidas, 2) estudiar, mediante el uso de inhibidores, el rol de dos familias de enzimas, el citocromo P450 (P450) y la glutatión-S-transferasa (GST), en la respuesta resistente al herbicida prosulfocarb y 3) estudiar las resistencias cruzadas a otros grupos de herbicidas. Además, en ensayos de laboratorio se estudió: 1) los niveles de expresión de la enzima *LrGST1* en estas poblaciones, y 2) se evaluó el potencial uso para el vallico de una herramienta de detección de resistencias a herbicidas rápida (BReD) inicialmente desarrollada para *Alopecurus myosuroides*, otra mala hierba.

Los experimentos se llevaron a cabo mediante la aplicación de dos inhibidores, el NBD-Cl (fungicida) para la GST, y el malatión (insecticida) para la P450, y posterior del herbicida prosulfocarb en plántulas de *L. rigidum* para el estudio en post-emergencia y semillas germinadas para el de pre-emergencia. Por otra parte, para conocer las resistencias cruzadas de nuestras poblaciones de vallico resistentes a prosulfocarb, se aplicaron herbicidas de los grupos HRAC K1, K3 y C2, propizamida, flufenacet y clortolurón, respectivamente. Para estos experimentos se realizó el posterior análisis de la supervivencia y reducción de peso fresco de la parte aérea. Los ensayos para comprobar el funcionamiento del kit BReD se llevaron a cabo mediante lecturas de la intensidad de la banda en el dispositivo *Lateral Flow Device* de hojas de vallico resistente y su posterior comparación con las concentraciones de *LrGST1* obtenidas mediante ELISA.

Las dos poblaciones resistentes utilizadas se mostraron resistentes al prosulfocarb y se observó una baja, aunque presente, resistencia cruzada a los herbicidas con distinto modo de acción testados. La aplicación del inhibidor de GST, NBD-Cl, no mostró ningún beneficio de sinergismo para la mortalidad o reducción de peso al aplicarse juntamente con prosulfocarb, tanto en pre como post-emergencia, indicando que este inhibidor no es apto para estudiar el potencial rol de la enzima GST en la resistencia metabólica en ensayos con planta viva. Tampoco se detectó una mejora en el efecto del prosulfocarb al aplicar el inhibidor de la P450, el malatión, en pre-emergencia, produciéndose incluso un incremento de la resistencia. En cambio, el malatión aplicado en post-emergencia redujo la resistencia en las dos poblaciones,

disminuyendo la supervivencia e incrementando la reducción de peso fresco, indicando que la P450 sí estaría implicada en la resistencia metabólica.

Finalmente, en plantas resistentes se obtuvieron concentraciones de la enzima *LrGST1* muy superiores a plantas sensibles, correspondiéndose con las intensidades de las bandas del *Lateral Flow Device*. Por un lado, se confirmó que la GST también estaría implicada en el mecanismo de resistencia por metabolismo aumentado y, también podría indicar que potencialmente es posible una adaptación del kit para uso en campo para el vallico como test de detección rápida.

## RESUM

El margall (*Lolium rigidum*) és la espècie més propensa a desenvolupar resistències a herbicides en tot el món. A Espanya es considera la mala herba amb major impacte negatiu en els cereals d'hivern. Aquesta espècie pot desenvolupar resistència a tots els herbicides disponible, tant per mecanismes lligats al lloc d'acció, com per mecanismes no lligats al lloc d'acció. Entre els mecanismes no lligats al lloc d'acció, el més preocupant es la capacitat augmentada de metabolitzar els herbicides (a diferencia d'una planta sensible), perquè es precisament aquest mecanisme el que pot produir resistència a diversos herbicides amb diferents modes d'acció.

A Espanya, ja hi ha poblacions de *L. rigidum* en cereals d'hivern que no son controlades amb la majoria d'herbicides del mercat, però els seus mecanismes de resistències no lligats al lloc d'acció no han estat estudiats. A més, disposar d'eines de detecció ràpida de la presència de metabolisme augmentat com a mecanisme de resistència, seria una informació molt valuosa en l'ajuda a la presa de decisions per a racionalitzar l'ús dels herbicides, com marca la directiva europea.

Els objectius d'aquest treball van ser, mitjançant assajos d'hivernacle, 1) confirmar la resistència al l'herbicida prosulfocarb (grup HRAC N) en dos poblacions amb resistència múltiple a diversos herbicides, 2) estudiar mitjançant l'ús d'inhibidors, el rol de dues famílies d'enzims, el citocrom P450 (P450) i la glutatió-S-transferasa (GST), en la resposta resistent a l'herbicida prosulfocarb i 3) estudiar la resistència creuada a altres grups d'herbicides. A més, en assajos de laboratori es va estudiar: 1) els nivells d'expressió de l'enzim *LrGST1* en aquestes poblacions, i 2) es va avaluar la potencial utilització per al margall de la eina de detecció de resistències a herbicides ràpid (BReD) inicialment desenvolupat per al *Alopecurus myosuroides*, una altra mala herba.

El experiments es van portar a terme mitjançant l'aplicació de dos inhibidors, el NBD-Cl (fungicida) per la GST i el malatió (insecticida) per la P450, i posteriorment de l'herbicida prosulfocarb en plàntules de *L. rigidum* per l'estudi en post-emergència i llavors germinades per al de pre-emergència. D'altra banda, per a conèixer les resistències creuades de les nostres poblacions de margall resistent a prosulfocarb, es van aplicar herbicides dels grups HRAC K1, K3 y C2, propizamida, flufenacet i clortoluró, respectivament. Per a aquests experiments es va realitzar el posterior anàlisi de la supervivència i reducció de pes fresc de la part aèria. Els assajos per a comprovar el funcionament del kit BReD es van dur a terme per mitjà de lectures de la intensitat de la banda en el dispositiu *Lateral Flow Device* de fulles de margall resistent i la seva posterior comparació amb les concentracions de *LrGST1* obtingudes per mitjà de l'ELISA.

Les dues poblacions resistents utilitzades es van mostrar resistents al prosulfocarb i es va observar una baixa, però present, resistència creuada als herbicides de diferents modes d'acció testats. L'aplicació de l'inhibidor de GST, NBD-Cl, no va indicar cap benefici de sinergisme per a la mortalitat o reducció de pes al aplicar-se juntament con prosulfocarb, tant en pre como post-emergència, indicant que aquest inhibidor no es adequat per estudiar el potencial rol de l'enzim GST en la resistència metabòlica en assajos amb planta viva. Tampoc es va detectar una millora en l'efecte del prosulfocarb a l'aplicar l'inhibidor de la P450, el malatió, en pre-emergència, produint-se, fins i tot, un increment de la resistència. En canvi, el malatió aplicat en post-emergència va reduir la resistència en les dues poblacions, disminuint

la supervivència i incrementant la reducció de pes fresc, indicant que la P450 si estaria implicada en la resistència metabòlica.

Finalment, en plantes resistents es va obtenir concentracions de l'enzim *LrGST1* molt superiors a plantes sensibles, corresponent-se amb les intensitats de les bandes del *Lateral Flow Device*. Per una banda, es va confirmar que la GST també estaria implicada en el mecanisme de resistència per metabolisme augmentat i, també podria indicar que potencialment es possible una adaptació del kit para els seu us en camp per a margall com a test de detecció ràpida.

## SUMMARY

The rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) is the species most likely to develop herbicide resistances worldwide. In Spain it is considered the weed with the most negative impact on winter cereals. This species can develop resistance to all available herbicides, both by Target-Site resistance and by Non-Target-Site resistance mechanisms. Among the Non-Target-Site resistance mechanisms, the most worrying one is the increased ability to metabolize herbicides (unlike a sensitive plant), because it is specifically this mechanism that can give cross and multiple resistance to various herbicides with different modes of action.

In Spain, there are already populations of *L. rigidum* in winter cereals that are not controlled with most herbicides on the market, but the Non-Target-Site resistance mechanisms have not yet been studied. In addition, having rapid detection tools for the presence of increased metabolism as a resistance mechanism would be very valuable information and would help in decision-making to rationalize the use of herbicides, as indicated by the European directive.

The objectives of this work were, through greenhouse trials, 1) to confirm the resistance to the herbicide prosulfocarb (HRAC N group) in two populations with multiple resistance to several other herbicides, 2) to study, through the use of inhibitors in greenhouse tests, the role of two families of enzymes, cytochrome P450 (P450) and glutathione-S-transferase (GST), in the herbicide-resistant response to prosulfocarb, and 3) to study the cross-resistance patterns to other herbicides with different modes of action. In addition, through laboratory tests we studied: 1) the expression levels of *LrGST1* enzyme in these populations, and 2) the potential use for rigid ryegrass of a rapid herbicide resistance detection tool (BReD) initially developed for *Alopecurus myosuroides*, another weed.

The experiments were carried out by applying two inhibitors, NBD-Cl (fungicide) for GST, and malathion (insecticide) for P450, and subsequent prosulfocarb herbicide to *L. rigidum* seedlings in a post-emergence study and germinated seeds for a pre-emergence assay. On the other hand, to know the cross-resistance patterns of our prosulfocarb-resistant *L. rigidum* populations, herbicides of the HRAC groups K1, K3 and C2 (propyzamide, flufenacet and chlortoluron, respectively) were applied. For these experiments, subsequent analyses of survival and reduction of fresh weight of the aerial part were performed. The tests to verify the suitability of the BReD kit were carried out by readings of the intensity of the test line in the Lateral Flow Device of resistant annual ryegrass leaves and its subsequent comparison with the concentrations of *LrGST1* obtained by ELISA.

The two resistant populations used were resistant to prosulfocarb and a low, although present, cross resistance to herbicides with different modes of action tested was observed. The application of the GST inhibitor, NBD-Cl, showed no synergism for mortality or weight reduction when applied together with prosulfocarb, both in pre and post-emergence, indicating that this inhibitor is not suitable for studying the potential role of the GST enzyme in metabolic resistance in live plant assays. Moreover, there was not an improvement in the prosulfocarb efficacy when applying the P450 inhibitor, malathion, in pre-emergence, but a decrease (increasing resistance). In contrast, malathion applied in post-emergence reduced resistance levels in the two populations, decreasing survival and increasing the reduction of fresh weight, indicating that P450 would be involved in the metabolic resistance.

Finally, concentrations of the *LrGST1* enzyme obtained were much higher in resistant plants compared to sensitive ones, corresponding to the intensities of the Lateral Flow Device test lines. Therefore, it was confirmed that the GST would also be involved in the resistance

mechanism by increased metabolism and, it could also indicate that, it is possible to adapt the BReD kit for field use in *L. rigidum* populations with multiple herbicide resistance as a rapid detection test.

## Índice

1. Introducción .....	1
1.2. Bioquímica de la resistencia a herbicidas .....	1
1.2.1. Mecanismos de resistencia no ligados al sitio de acción .....	2
1.2.2. Resistencia múltiple y cruzada .....	2
1.2.3. La glutatión-S-transferasa .....	3
1.2.4. El citocromo P450 .....	3
1.3. Reversión de las resistencias (inhibidores de enzimas de degradación) .....	4
1.3.1. NBD-Cl.....	4
1.3.2. Malatión .....	5
1.4. Tecnologías de detección de resistencias a herbicidas en malas hierbas.....	5
1.4.1. Funcionamiento del Test por Inmunoensayo de Flujo Lateral.....	5
1.5. <i>Lolium rigidum</i> Gaud. ....	6
1.5.1. Resistencia a herbicidas en <i>Lolium rigidum</i> .....	7
1.6. Prosulfocarb .....	9
2. Objetivos: .....	10
3. Material y métodos .....	11
3.1. Poblaciones estudiadas .....	11
3.2. Material vegetal .....	12
3.3. Ensayos con herbicidas e inhibidores .....	12
Experimento PRE Prosulfocarb + NBD-Cl (B).....	13
Experimento POST Prosulfocarb + NBD-Cl (A) .....	13
Experimento PRE Prosulfocarb + Malatión (E) .....	13
Experimento POST Prosulfocarb + Malatión (C) .....	13
Experimento Herbicidas con diferentes modos de acción (D) .....	13
3.4. Aplicaciones.....	14
3.5. Kit BReD.....	15
3.5.1. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) .....	15
3.6. Parámetros analizados .....	16
3.7. Análisis estadístico .....	16
4. Resultados .....	18
4.1. Reversión de las resistencias.....	18
4.1.1 Experimento PRE NBD-Cl (B) .....	18
4.1.2. Experimento POST NBD-Cl (A).....	19
4.1.3. Experimento PRE Malatión (E) .....	19
4.1.4. Experimento POST Malatión (C).....	21



4.2. Resistencia múltiple y cruzada .....	25
4.3. Tecnologías de detección de resistencias a herbicidas en malas hierbas.....	27
5. Discusión .....	30
5.1. Reversión de las resistencias.....	30
5.2. Resistencia múltiple y cruzada .....	33
5.3. BReD kit .....	34
6. Conclusiones.....	36
7. Bibliografía .....	37
8. Anexo.....	41
Anexo 1. Secuencia nucleotídica de la GST de <i>Lolium rogidum</i> .....	41
Anexo 2. Secuencia aminoacídica de la GST de <i>Lolium rogidum</i> .....	41
Anexo 3. Análisis estadísticos.....	41
Anexo 4. Fotografías de los experimentos .....	43
9. Agradecimientos .....	46

## 1. Introducción

Las malas hierbas producen las mayores pérdidas potenciales de rendimiento en los principales cultivos base de la alimentación mundial (Oerke 2006). La herramienta más usada y efectiva para el control de las malas hierbas son los herbicidas, que son aplicados de forma sistemática y rutinaria (Vencill 2002). Este método de control puede llegar a ser un problema, ya que cuando un mismo herbicida se aplica sucesivamente varios años, la gran presión de selección ejercida puede acabar seleccionando los individuos resistentes al químico. De esta forma, se acaba provocando la evolución de poblaciones de malas hierbas resistentes a herbicidas de una misma familia química (HRAC 2019).

La aparición de resistencias a herbicidas es impulsada por las características de la biología de las poblaciones de malas hierbas, ya que suelen tener un amplio rango de variabilidad genética. Algunas plantas de una población pueden incluir rasgos genéticos de resistencia a herbicidas específicos. Cuando se aplica un herbicida, la mayoría de las plantas susceptibles se controlan, pero las plantas resistentes continúan creciendo, y con la aplicación continua del mismo herbicida, eventualmente se matarían las plantas susceptibles, se seleccionarían plantas resistentes y la población de malas hierbas estaría dominada por plantas resistentes (HRAC 2019). La evolución de la resistencia a los herbicidas depende de varios factores, como la química del herbicida, la intensidad de la presión de selección (dosis del herbicida), la duración de la exposición, la biología de la especie y varios factores genéticos, incluida la frecuencia de los alelos de resistencia en las poblaciones de mala hierba, el modo de herencia de la resistencia y los costes en la aptitud biológica asociados con la resistencia (Loureiro et al. 2017).

Las resistencias provocan el aumento de las dosis para mantener eficacias o aplicaciones inútiles debido a la pérdida total de eficacia incluso a dosis muy altas, produciendo un gran impacto medioambiental. Asimismo, la resistencia a herbicidas podría considerarse como la mayor amenaza actual para la sostenibilidad de la producción agrícola global. Es por eso, que conocer los mecanismos de resistencia y desarrollar herramientas de detección precoz es esencial para impulsar un uso más racional de los herbicidas (Powles y Yu 2010).

En este sentido, la Directiva Europea 2009/128/CE relativa al Uso Sostenible de Fitosanitarios, con transposición en España a través del Real Decreto 1311/2012, tiene como finalidad establecer un marco jurídico común para conseguir el uso sostenible de los plaguicidas, teniendo en cuenta los enfoques cautelares y preventivo. Por eso, el objetivo de la reducción de los riesgos y los efectos del uso de los plaguicidas en la salud humana y el medio ambiente, se consigue mediante el desarrollo de herramientas de gestión integrada de malas hierbas, planteamientos o técnicas alternativas y técnicas de detección rápida de resistencias.

### 1.2. Bioquímica de la resistencia a herbicidas

La resistencia a herbicidas se define como la habilidad heredada de una mala hierba para sobrevivir a una dosis de herbicida con la cual normalmente se tendría un control efectivo. La resistencia puede ser dada por dos tipos de mecanismos: los ligados al modo de acción (MoA) del herbicida (target-site resistant o TSR en inglés), y los no ligados al sitio de acción (non-target-site resistant o NTSR en inglés) (HRAC 2019).

Los mecanismos TSR son los más comunes y suelen implicar una mutación puntual del gen que codifica la enzima diana, que suele ser una enzima con una función vital en la planta. El

cambio de un solo aminoácido en la enzima impide la unión del herbicida y que conducen a una sensibilidad reducida a la actuación del herbicida. También pueden ser debidos a una sobreexpresión de la enzima diana que es capaz de compensar la inhibición del herbicida y mantener las funciones fisiológicas normales (Powles y Yu 2010, Cummins et al. 2013).

Debido a su naturaleza compleja, la resistencia del tipo NTSR es menos conocida, sobre todo a nivel molecular y genético, y por eso mismo se considera una gran amenaza para la sostenibilidad de los herbicidas (Délye 2013). En las plantas, los mecanismos NTSR minimizan la cantidad de herbicida activo que llega a su diana, ya sea debido a una disminución en la absorción, una translocación reducida o aumentada para su excreción, un aumento de la degradación a compuestos no tóxicos (resistencia metabólica), su secuestro en algún compartimento celular como las vacuolas, o combinaciones de algunos de estos procesos. De estos, la resistencia metabólica es el mecanismo NTSR más comúnmente presente en malas hierbas resistentes a herbicidas (Ma et al. 2016, Yu y Powles 2014).

#### 1.2.1. Mecanismos de resistencia no ligados al sitio de acción

El citocromo P450 (P450), la glutatión-S-transferasa (GST) y la glicosiltransferasa (GT) son las principales superfamilias de enzimas, que, además de tener muchas funciones en el metabolismo primario y secundario de las plantas, logran la degradación de herbicidas (Yu y Powles 2014). Por ejemplo, algunas P450 pueden catalizar una hidroxilación del herbicida, que puede ir seguida por la conjugación de una glucosa mediante la GT (Figura 1). Ciertos herbicidas también se pueden inactivar directamente por la conjugación de un tripéptido, el glutatión (GSH), catalizada por la GST (Yu y Powles 2014).

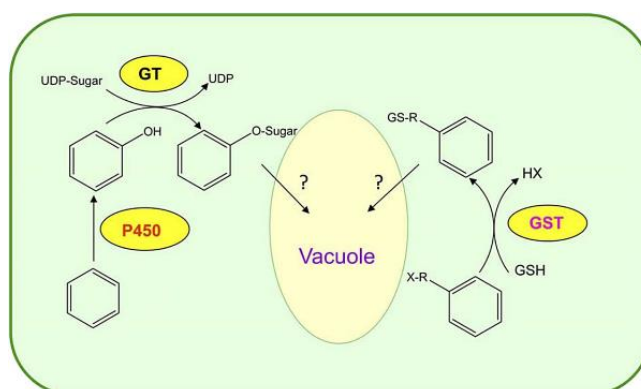


Figura 1. Mecanismos de degradación de herbicidas por la vía de la enzima P450 y la vía de GST.

En las malas hierbas, la resistencia metabólica a herbicidas se asocia con niveles elevados de estas enzimas de las rutas de degradación en plantas debido a su sobreexpresión constitutiva, incluidas la P450, la GS y las GST, así como proteínas transportadoras de membrana de la superfamilia ABC, entre otros (Ghanizadeh y Harrington 2017). Por otro lado, se desconoce si la sobreexpresión de algunos de estos genes asociados a la resistencia metabólica estaría sujeta a control epigenético bajo la selección de herbicidas (Yu y Powles 2014).

#### 1.2.2. Resistencia múltiple y cruzada

La resistencia cruzada se presenta cuando una población de malas hierbas es resistente a dos o más herbicidas de la misma o diferente clase química, debido a la presencia de un mecanismo de resistencia único. Por su parte, la resistencia múltiple puede darse en respuesta al uso de dos o más herbicidas con diferente modo de acción, con lo que se tiene una selección de dos o

más mecanismos de resistencia (CPRH 2019, Prado 2011). La resistencia metabólica puede conferir tanto resistencia cruzada como resistencia múltiple, debido a la capacidad de los enzimas anteriormente citados de degradar herbicidas muy diferentes, y puede conferir resistencia a herbicidas a los que las plantas nunca han estado expuestas (Busi et al. 2012). Por lo tanto, la resistencia cruzada y múltiple por metabolismo aumentado es una gran amenaza, ya que puede conferir resistencia a cualquier herbicida existente (Yu y Powles 2014), incluso nuevos o aún por descubrir o comercializar (Busi et al. 2012). Varios estudios han proporcionado evidencias de que algunas especies de malas hierbas tienen resistencia múltiple debido a altas tasas de degradación de herbicidas de manera similar a como lo haría un cereal (Cummins et al. 2013). La resistencia por metabolismo aumentado y la resistencia múltiple están muy extendidas en algunas malas hierbas de la familia de las gramíneas, y son cada vez más frecuentes en algunas otras especies (Yu y Powles 2014). Por todas estas razones la resistencia metabólica a herbicidas es una gran amenaza porque estas poblaciones de malas hierbas son muy difíciles de controlar y manejar (Busi et al. 2014).

#### 1.2.3. La glutatión-S-transferasa

La superfamilia GST es especialmente grande y diversa en las plantas. En plantas, las GST participan tanto del metabolismo celular normal como en la protección de las células frente a estreses bióticos y abióticos, como es la degradación de una gran variedad de compuestos xenobióticos (Mars 1996). La superfamilia de la GST es especialmente grande y diversa en las plantas superiores, que tienen al menos diez clases de GST diferentes. Hay evidencias de que algunas de las clases predominantes, como las Phi y Tau, son las principales responsables de la degradación de xenobióticos como los herbicidas (Burns et al. 2017, Busi y Powles 2013).

La GST es la responsable de la selectividad de algunos modos de acción herbicida en los cereales, como los grupos N y K. Se sabe que altos niveles de sobreexpresión de los genes de la familia de la GST, como las clases Phi y Tau, confieren la capacidad de degradar estos y otros herbicidas en diversas malas hierbas de la familia de las gramíneas (Busi et al. 2017, Dücker et al. 2019a; 2019b).

El gen de *L. rigidum* (*LrGSTF1*) que codifica la GSTF1 de la clase Phi tiene un 91% de identidad con la correspondiente *AmGSTF1* de *A. myosuroides*. Ambas enzimas recombinantes tenían actividades enzimáticas similares, siendo la glutatión peroxidasa (GPOX) altamente activas, de dos a cuatro veces más altas que en plantas sensibles y mostrando una capacidad limitada para catalizar la conjugación de glutatión. Además, la expresión de *AmGSTF1* en *Arabidopsis* daba como resultado un fenotipo de resistencia múltiple, dando a entender que las GST individuales confieren tolerancia a los herbicidas como consecuencia directa de las desintoxicantes xenobióticas y que una sola proteína tiene un papel tan importante en el control del fenotipo complejo de MHR (Cummins et al. 2013).

#### 1.2.4. El citocromo P450

La superfamilia del P450 es una gran y diversa superfamilia de hemoproteínas que pertenece al metabolismo secundario desempeñando papeles vitales en el crecimiento de las plantas, y su defensa y protección. Sus actividades se separan en dos clases: la involucrada en vías biosintéticas y la de desintoxicación de sales de metales pesados y herbicidas (Xu et al. 2015).

El P450 cataliza principalmente hidroxilaciones y desmetilaciones de los herbicidas (Preston et al. 1996). Actualmente se cree que hay múltiples isoformas del P450 con especificidad de

herbicida variable, por lo tanto, capacidad variable para la degradación de herbicidas diferentes entre sí (Siminszky 2006, Powles y Yu 2010). Hay diversos estudios que apuntan que hay una sobreexpresión de los genes que codifican estas isoformas del P450 en plantas resistentes por metabolismo respecto a plantas sensibles (i.e. Duhoux y Délye 2013). En los últimos años se han empezado a identificar los diferentes genes del P450 responsables de la resistencia NTSR por metabolismo en algunas especies de plantas, como el arroz (Saika et al. 2014), el trigo y la cebada (Gion et al. 2014), o malas hierbas como *Echinochloa phyllopogon* (Iwakami et al. 2014) o *Lolium rigidum* (Duhoux y Délye 2013).

### 1.3. Reversión de las resistencias (inhibidores de enzimas de degradación)

Los mecanismos NTSR por metabolismo aumentado se pueden estudiar e identificar *in vivo* mediante la inhibición de las rutas de degradación que otorgan la resistencia a la planta. Múltiples investigaciones han demostrado que hay algunas sustancias que revierten químicamente la resistencia metabólica a herbicidas en malas hierbas (Yu y Powles, 2014). Es decir, una planta resistente en presencia del herbicida se sensibiliza si además, se aplica un inhibidor de la ruta de degradación del herbicida. Este hecho permitiría discernir indirectamente los potenciales enzimas responsables de la respuesta resistente si se conoce cuáles son inhibidos que funcionan. Por ejemplo, se conoce desde hace tiempo la capacidad de ciertos insecticidas organofosforados de tener una acción sinérgica con los herbicidas inhibiendo el P450 y son habitualmente usados en este tipo de estudios (i.e. Busi et al. 2017, Oliveira et al. 2018, Preston et al. 1996).

En cambio, se conocen pocos inhibidores de la GST que se puedan utilizar *in vivo* en plantas, entre los que se encuentran el tridifane y el NBD-Cl. El tridifane se ha utilizado en muy pocos estudios, en parte, porque es un químico peligroso debido a que inhibe el P450 y la GST a la vez, haciendo que sea muy potente (Letouzé y Gasquez 2003). También hay pocos estudios que han demostrado con éxito el uso del NBD-Cl para revertir la resistencia por metabolismo aumentado en malas hierbas inhibiendo la GST (Cummins et al. 2013). Finalmente, no hay ningún estudio conocido que utilice inhibidores de la GT, la tercera gran familia de enzimas de degradación en plantas.

#### 1.3.1. NBD-Cl

Se han utilizado ya en laboratorio inhibidores para alterar las GST que provocan resistencia a herbicidas a través de múltiples mecanismos. Estos inhibidores pueden subdividirse en conjugados de glutatión (GSH) y peptidomiméticos relacionados que se unen en el sitio de unión de GSH en la enzima GST y compuestos que actúan sobre el gran dominio de unión hidrofóbico (Cummins et al. 2013).

El 4-cloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) es un sustrato para la GST que tiene como producto resultante de la conjugación con el glutatión, el 7-glutationil-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBS-SG). Las investigaciones de Cummins et al. (2013) demostraron que el NBD-Cl inhibe la GSTF1 (clase Phi de las GST) y mejoraba la fitotoxicidad de dos herbicidas con distintos MoA en malas hierbas gramíneas con resistencia múltiple por metabolismo aumentado, sin mostrar daños en las hojas o inhibición del crecimiento. La utilización del NBD-Cl la tuvieron a partir de las investigaciones de Ricci et al. (2005), que utilizaban el NBD-Cl y otros derivados de tioéter de NBD como inhibidores potentes de las GST humanas (GSTP) al actuar como "sustratos suicidas". Aun así, el uso posterior del NBD-Cl para la reversión de resistencias en malas hierbas y demostrar el rol de la GST son muy escasas (Ma et al. 2016, Brabham et al. 2019).

### 1.3.2. Malatión

La evidencia de que el P450 es el grupo de enzimas más común implicado en la resistencia por metabolismo aumentado se ha obtenido de experimentos *in vivo*, utilizando inhibidores como el malatión (Christopher et al. 1994, Tardif y Powles 1999). El malatión en presencia del P450 genera un reactivo intermedio que inhibe a la enzima (Yu et al., 2004).

El malatión es un insecticida organofosforado de amplio uso en agricultura (sin registro en Europa) que ha demostrado efectos inhibitorios sobre P450 específicas involucradas en las rutas de degradación de herbicidas, debido a una interacción sinérgica entre el insecticida y el herbicida que conduce a mayores niveles de fitotoxicidad en la planta (Busi et al. 2017). Por el contrario, el inhibidor solo no tiene efecto (Paporisch y Rubin 2017).

## 1.4. Tecnologías de detección de resistencias a herbicidas en malas hierbas

A parte de la gestión integrada de la resistencia a herbicidas de las malas hierbas, el desarrollo de técnicas para su detección rápida es otro de las tecnologías que promueve el Directiva Europea 2009/128/CE. El grupo de investigación del profesor Robert Edwards de Newcastle University ha desarrollado la ciencia que sustenta BReD, la nueva herramienta de diagnóstico de resistencia al “blackgrass” (*Alopecurus myosuroides*), la principal mala hierba en los cereales ingleses.

Hoy en día, los mecanismos tipo TSR son de detección rápida porque se pueden secuenciar muy fácilmente las posiciones conocidas del gen de la proteína que confieren resistencia. En cambio, para los mecanismos NTSR por metabolismo los métodos de prueba actuales requieren usar semillas o plantas, lo que genera demoras en la toma de decisiones informadas sobre las opciones de control. BReD permite a los agricultores conocer de forma inmediata la presencia de resistencia por metabolismo aumentado en poblaciones de *A. myosuroides*.

Se trata de un inmunoensayo de flujo lateral (*Lateral flow immunoassay*) rápido para detectar y cuantificar la proteína glutatión-S-transferasa (concretamente la *AmGSTF1* de la clase phi), que se encuentra en altas concentraciones en poblaciones de *A. myosuroides* resistentes a múltiples MoA. Estudios previos han demostrado que esta GST es un buen biomarcador, en esta y otras especies, de la presencia de metabolismo aumentado independientemente de la ruta metabólica o enzimas implicados (Cummins et al. 2013).

El *Lateral flow immunoassay* detecta un biomarcador (analito) específico de la muestra. Los anticuerpos específicos del biomarcador *AmGSTF1* son unidos en la membrana de nitrocelulosa. Los anticuerpos pueden detectar la presencia de *AmGSTF1* y en combinación con el lector puede usarse para cuantificar el biomarcador.

Debido a la gran similitud estructural entre la proteína biomarcador *AmGSTF1* de BReD y la GST de nuestra mala hierba problema, *LrGSTF1*, con un 91% de identidad, sería posible que el inmunoensayo funcionase también en muestras *L.rigidum*.

### 1.4.1. Funcionamiento del Test por Inmunoensayo de Flujo Lateral

Un Inmunoensayo de Flujo Lateral se considera una prueba de detección visual, tanto para un analito, como para varios. Estos ensayos se basan en la migración de un fluido a través de unas tiras de nitrocelulosa, las cuales normalmente se suelen colocar sobre un soporte de plástico.

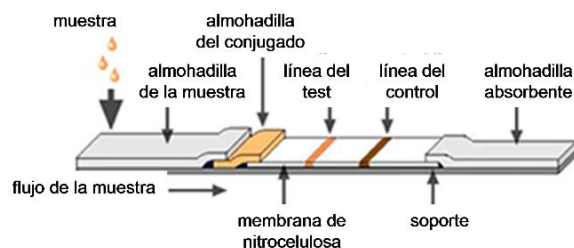


Figura 2. Partes internas del test por Inmunoensayo de Flujo Lateral

Se añade la disolución de la muestra en una zona formada por una almohadilla absorbente, la almohadilla de la muestra (Figura 2). El fluido migra a través de esta almohadilla hasta llegar a la zona de almohadilla del conjugado, en donde se ha inmovilizado el anticuerpo conjugado (marcado con partículas coloreadas como oro coloidal o microesferas de látex). A continuación, la muestra sigue migrando a través de la membrana hasta llegar la zona de captura, donde el complejo analito anticuerpo-conjugado se une a anticuerpos inmovilizados, produciendo una línea visible. Pasada esta línea la muestra continúa migrando hasta que llega a la zona de control, donde un exceso de anticuerpo conjugado se une y produce una segunda línea visible, conocida como línea de control, que es la que nos confirma que la muestra ha migrado a través de la membrana (Posthuma-Trumpie y Van Amerongen 2009).

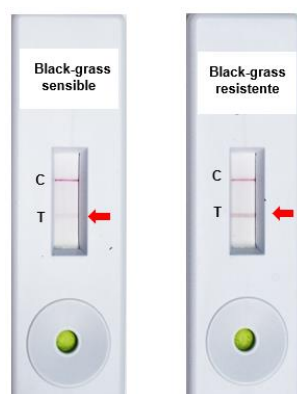


Figura 3. Resultado negativo (izquierda) y positivo (derecha) del test de Inmunoensayo de Flujo Lateral.

Si la proteína AmGSTF1 está presente en altas concentraciones, aparece la línea de test en el kit de detección BReD después de 5 minutos de reacción (Figura 3). Su cuantificación se hace midiendo la intensidad de la banda del *Lateral Flow Device* usando un lector digital ([www.optricon.de](http://www.optricon.de)), que da un valor numérico directamente proporcional a la intensidad de la banda. A mayor sea el número de la lectura mayor será el nivel de AmGSTF1 en la muestra, que corresponderán con mayores niveles de metabolismo aumentado en la planta.

### 1.5. *Lolium rigidum* Gaud.

La especie de mala hierba estudiada en este trabajo es la gramínea *Lolium rigidum* Gaud., comúnmente llamada vallico. Es una de las principales malas hierbas a nivel mundial ya que es la especie capaz de desarrollar resistencias a más herbicidas diferentes (Heap 2019). En el género *Lolium* se incluyen cuatro especies diferentes: *L. rigidum* Gaud, *L. multiflorum* Lam., *L. temulentum* L. y *L. perenne* L.. A nivel español, y Cataluña en particular, la especie infestante de los cereales de invierno es, prácticamente de forma única, *L. rigidum* (Taberner 1996).

El vallico es una especie nativa del Mediterráneo y se caracteriza por medir entre 20 y 60 cm, y tener las hojas muy brillantes por el envés. Es una gramínea anual, con polinización cruzada y



anemófila, diploide, y con elevada variabilidad genética, de tal manera que son posibles los híbridos incluso entre diferentes especies del género (Taberner 1996). Destaca por su alta densidad de infestación y elevada capacidad de producción de semillas, entre 900 y 1.500 semillas por planta (Izquierdo et al. 2003). Estas características biológicas hacen que esta especie sea muy proclive al desarrollo de resistencias a herbicidas (Busi et al. 2012). Además, en esta especie se ha demostrado que la transferencia de los genes de resistencia por polinización cruzada entre plantas de poblaciones distantes es posible, y de hecho ha contribuido a la propagación de la resistencia (Busi et al. 2008, Loureiro et al. 2017).

Se trata de la mala hierba más prevalente y dañina de los cereales de invierno en España y especialmente en la zona de Lleida (Taberner 1996). Sus infestaciones son importantes y producen daños en los cultivos de trigo y cebada, causando pérdidas de rendimiento, de tal manera que se han observado mermas hasta de un 85% de la cosecha en cebada (Izquierdo et al. 2003).

#### 1.5.1. Resistencia a herbicidas en *Lolium rigidum*

Dentro de la gama de herbicidas registrados en España y Europa, sólo hay unos pocos que sean eficaces contra *L. rigidum* y selectivos en cereales (excepto los herbicidas no selectivos de pre-siembra). Los herbicidas, clasificados según el momento de aplicación, son (Figura 4):

- Pre-siembra: glufosinato (Grupo H, inhibidor de la glutamina sintetasa) y glifosato (Grupo G, inhibidor de la EPSP sintasa).
- Pre-emergencia (PRE): clortolurón (Grupo C2, inhibidor del fotosistema II), clorsulfurón (Grupo B, inhibidor de la ALS sintasa) y prosulfocarb (Grupo N, inhibidor de la síntesis de ácidos grasos).
- Post-emergencia (POST): diclofop, tralkoxidim, pinoxaden (los tres del Grupo A, inhibidores de la ACCasa), flufenacet (Grupo K3) e iodosulfurón (Grupo B).

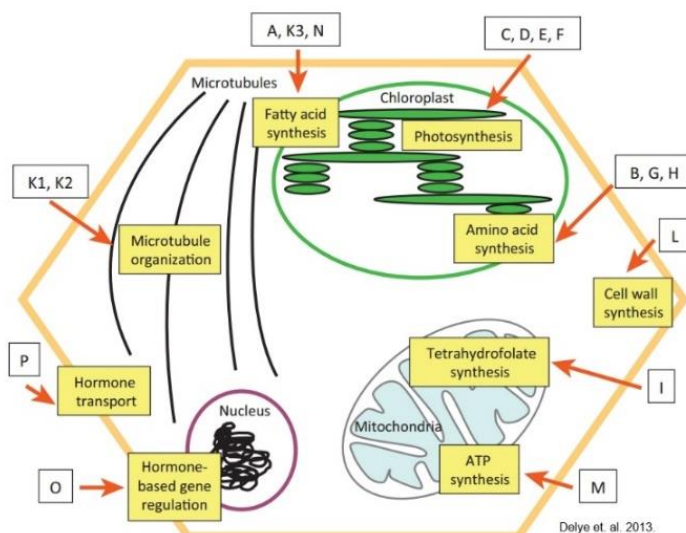


Figura 4. Representación de los diferentes modos de acción de herbicidas dentro de una célula vegetal.

Para *L. rigidum* se han registrado resistencia a 15 MoAs herbicidas en 12 países (Heap 2019), incluyendo todos los anteriormente citados. Ninguna otra especie ha desarrollado resistencia contra tanta diversidad de clases químicas herbicidas. Incluso se ha encontrado resistencia a al



menos 9 MoAs diferentes en una sola población de *L. rigidum*. Muchos de estos casos de resistencia se basan en un metabolismo aumentado, que puede conferir resistencia múltiple y cruzada a otros herbicidas de forma impredecible (Dücker et al. 2019a). De hecho, se está llevando a malas hierbas como *L. rigidum* a "mimetizarse bioquímicamente" con el cultivo del cereal, para poder sobrevivir a los herbicidas utilizados.

Así pues, la resistencia metabólica en *L. rigidum* está muy extendida. Yu y Powles en 2014 analizaron poblaciones de *L. rigidum* resistente de Francia y reveló que el 72% de las poblaciones mostraron resistencia metabólica y solo el 28% de las poblaciones poseían únicamente resistencia TSR.

La presencia del metabolismo aumentado por P450 en poblaciones de *L. rigidum* con resistencia múltiple se ha demostrado usando inhibidores. Así, la aplicación de malatión tiene un efecto sinérgico y disminuye la velocidad de degradación de herbicidas de al menos 4 MoA diferentes (Busi et al. 2017, Paporisch y Rubin 2017, Preston et al. 1996, Tardif y Powles 1999). Aun así, no se vio efectos del malatión sobre triallato y clomazona (Tardif y Powles et al. 1999).

Durante los años ochenta y noventa, el manejo de herbicidas fue mediante herbicidas de POST como el diclofop y otros inhibidores de la ACCasa, y el clorsulfurón (Grupo B). Sin embargo, la resistencia evolucionó rápidamente, y Heap (2019) ya informó por primera vez la evolución de la resistencia cruzada y múltiple a estos y más herbicidas en 1982.

En España, los primeros casos de fallos de control en *L. rigidum* con diclofop y clortolurón se citaron en campos de Cataluña (Recasens et al. 1996), mientras que se encontraron fallos en el control con clorsulfurón en Castilla-León (de la Carrera et al. 1999). En Cataluña, en la actualidad, el 83% de los campos muestreados presentan resistencia al diclofop, mientras que los resistentes al clortolurón han aumentado del 10% al 92%, y del 40% al 75% para el clorsulfurón (Loureiro et al. 2017). Estos datos ponen de manifiesto la gravedad del problema en nuestro país.

En los últimos años, con la evolución de la resistencia múltiple a los herbicidas habituales de PRE (Grupos C2 y B) y en POST (Grupos A y B) en cereales, los agricultores empezaron a aplicar con otros MoAs, sobre todo en PRE y POST precoz. Esto ha provocado una mayor dependencia a otros herbicidas como la trifluralina (Grupo K1, sin registro en Europa), el flufenacet y piroxasulfona (Grupo K3), y los herbicidas del Grupo N, como el prosulfocarb (Brunton et al. 2019). Como el flufenacet tiene una eficacia limitada en la zona climática mediterránea, y la piroxasulfona está teniendo dificultades para ser registrada en Europa, solo el prosulfocarb se mantiene como la única herramienta química para el control de poblaciones de *L. rigidum* con resistencia múltiple en cereales (Brunton et al. 2018, Dücker et al. 2019). El escenario no es nada alentador, teniendo en cuenta que no se ha introducido ningún herbicida con un MoA nuevo durante más de 20 años (Duke 2012) y que seguramente más herbicidas van a perder el registro.

Hasta hace poco no se habían encontrado resistencias a estos herbicidas, prosulfocarb (N), piroxasulfona (K3) o flufenacet (K3), pero en Australia ya se ha descrito las primeras poblaciones evolucionadas en campo con resistencia múltiple y cruzada a ellos (Brunton et al. 2018, 2019). Además, se ha demostrado en invernadero que, si selecciona de forma recurrente una población con resistencia a la piroxasulfona, presentará resistencia cruzada y múltiple al prosulfocarb, y viceversa (Busi y Powles 2013). De forma similar, muy recientemente, en varios países de Europa ya se han encontrado poblaciones con resistencia de tipo metabólica por GST al flufenacet (Grupo K3) y que presenten resistencia múltiple y cruzada a otros herbicidas de

pre-emergencia como el prosulfocarb (Dücker et al. 2019a). El escenario no es nada alentador, tampoco en España, porque los primeros casos de fallos de control con el herbicida prosulfocarb se han reportado en campos de Cataluña y Castilla y León (CPRH 2015).

### 1.6. Prosulfocarb

En este estudio nos centramos en el producto químico prosulfocarb (y su resistencia), que pertenece a la familia química de los tiocarbamatos dentro del grupo N. Los tiocarbamatos se utilizan principalmente en la agricultura. Los herbicidas tiocarbamatos se introdujeron en los mercados a partir de la década de 1960, y el prosulfocarb se introdujo como "un nuevo herbicida selectivo para uso en cereales de invierno" en 1987 (Glasgow et al. 1987). Los herbicidas del grupo N son selectivos en las plantas de trigo porque la GST es capaz de conjugar la molécula herbicida con el glutatión para iniciar la ruta metabólica de degradación, a diferencia de las malas hierbas (Fuerst 1987).

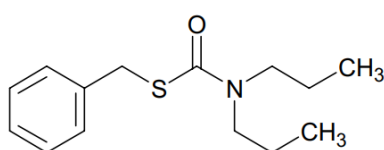


Figura 5. Estructura química del prosulfocarb.

El prosulfocarb es un compuesto de amplio espectro que controla las principales gramíneas y también muchas dicotiledóneas (Figura 5). Los síntomas del prosulfocarb incluyen retraso del crecimiento, hojas acortadas y engrosadas, engrosamiento del coleóptilo, falta de despliegue correcto de las hojas, oscurecimiento de las hojas y daño en la raíz.

El prosulfocarb tiene como MoA la inhibición de síntesis de lípidos en la región meristemática, pero sin una inhibición de la ACCasa (grupo A, otro MoA), provocando la alteración de la membrana celular. Se trata de un herbicida de aplicación PRE o POST temprana, que es absorbido por raíces, hojas y semillas cuando éstas germinan y se transporta a las zonas meristemáticas. En Europa, las dosis de registro son entre 2,000 y 4,000 g i.a. ha<sup>-1</sup>, que son muy altas en comparación con otros herbicidas. Esto puede suponer un problema en el futuro para mantener el registro de este herbicida en Europa.

El gen de *L. rigidum* (LrGSTF1) que codifica la GSTF1 de la clase Phi tiene un 91% de identidad con la correspondiente AmGSTF1 de *A. myosuroides* (Cummins et al. 2013). Debido a la gran similitud estructural entre la proteína biomarcadora AmGSTF1 usada en el kit de detección rápida BReD y la GST de nuestra mala hierba problema, quizás sería posible que el inmunoensayo funcionase también en muestras vegetales de *L. rigidum*. El correcto funcionamiento del kit en *L. rigidum* permitiría a los agricultores tener un mecanismo de detección rápido y relativamente barato de resistencias metabólicas y múltiple a los herbicidas en uso. De esta forma, el agricultor se ahorraría la aplicación inefectiva de químicos.

## 2. Objetivos:

El objetivo principal de este proyecto ha sido el estudio de los mecanismos NTSR de tipo metabólico mediante el análisis del rol tanto de la GST como del P450 en la resistencia al herbicida prosulfocarb en la mala hierba más problemática de cereales de invierno en España, *Lolium rigidum*. El estudio se ha basado en el uso de sustancias químicas inhibidores de estas enzimas de degradación (como insecticidas) y provocar la inversión de la resistencia en biotipos con resistencia múltiple, que han demostrado su eficacia ante otros herbicidas en *L. rigidum* y otras especies de malas hierbas.

Para ello se realizaron experimentos dosis-respuesta en laboratorio e invernadero utilizando un inhibidor de la enzima GST, el NBD-Cl. De la misma forma, se estudió el rol del P450, mediante la utilización de un inhibidor de esta enzima, el malatión. Se espera que la aplicación conjunta del herbicida y el inhibidor revierta el fenotipo de resistente a sensible en las poblaciones de *L. rigidum*, a diferencia de la aplicación del herbicida o el inhibidor únicamente.

Es por ello que en el presente proyecto se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- ❖ Inhibir la GST y P450 vía foliar mediante aplicación de NBD-Cl o malatión en POST a dosis elevadas y prosulfocarb.
- ❖ Inhibir la GST vía raíces mediante la germinación de semillas en placas de Petri con inhibidor y pre-aplicación del herbicida tras el transplante en maceta.
- ❖ Inhibir la GST y P450 vía raíces mediante pre-aplicación del inhibidor y herbicida una vez transplantadas las semillas germinadas.
- ❖ Caracterizar el patrón de resistencia cruzada y múltiple a otros MoAs (grupos K1, K3, C2 y N) en biotipos con resistencia al herbicida prosulfocarb, para mejorar la predicción de eficacias en sistemas de ayuda a la toma de decisiones.
- ❖ Comprobar la eficacia del *kit* británico de detección de resistencias metabólicas, BReD, en *L. rigidum*.

### 3. Material y métodos

Este Trabajo de Fin de Master se enmarca dentro de una colaboración con el grupo de investigación del profesor Robert Edwards de la Newcastle University, experto en metabolismo de xenobióticos en plantas. Además, este trabajo ha sido financiado por AEI/FEDER, UE a través del proyecto AGL2017-83325-C4-2-R"

#### 3.1. Poblaciones estudiadas

Una población estándar de *L. rigidum* susceptible (S1) a herbicidas se utilizó como control para verificar la eficacia y posible resistencia de los herbicidas, que fue recolectada en verano de 2018. Esta población viene de Ballobar (Huesca), nunca ha recibido herbicidas, y está en zona donde no se conocen problemas de resistencia a herbicidas en la especie. También se utilizó una supuesta población de *L. rigidum* también sensible a herbicidas (Lm). Pero su crecimiento anormalmente rápido y vigoroso, nos hizo sospechar que era otra especie de *Lolium*. Unas pocas plantas se dejaron crecer hasta floración, y posteriormente se confirmó que se trataba de la especie *L. multiflorum*. Por lo tanto, se eliminó del presente estudio.

Como poblaciones potencialmente resistentes a prosulfocarb se utilizaron las especificadas en la Tabla 1. Estas semillas fueron amablemente cedidas por el Servei de Protecció dels Vegetals del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació de la Generalitat de Catalunya (Dr. Andreu Taberner y Dr. José M<sup>a</sup> Montull).

Tabla 1. Poblaciones utilizadas en los ensayos del proyecto realizados.

Población	Año recolección	Localidad	Supuesto perfil	Cantidad de semillas disponible
S1	2018	Ballobar	Sensible	1017
Lm	?		Sensible	Ilimitada
R1	2015	Calonge de Segarra	Resistente a prosulfocarb y clortolurón	1124
R2	2015	Calonge de Segarra	Resistente a prosulfocarb	1064

También se utilizaron poblaciones de *Lolium rigidum* de referencia con resistencias NTSR obtenidas de Herbiseeds para el experimento del BReD kit. El origen de SLR31, VLR69 se encuentra en Wimmera, Australia. Se ha informado que la población SLR31 desarrolla resistencia al ariloxifenoxipropionato, ciclohexadiona, sulfonilurea, imidazolina, dinitroanilina y carbamato, mientras que la población VLR69 es resistente a la urea y la atrazina ([www.herbiseed.com](http://www.herbiseed.com)). Además, también se utilizó la población resistente R<sub>Lr</sub> originaria de la Universidad de Newcastle.

Se partió de una cantidad reducida de semillas tanto de la población sensible como de las resistentes, lo cual condicionó el número y dosis de herbicidas testados.

La resistencia y susceptibilidad a herbicidas de distintos modos de acciones fueron estudiadas, mediante la aplicación del herbicida en campo, previamente en las poblaciones de estudio, entre las cuales se encuentran probablemente resistencias múltiples y cruzadas (Tabla 2).

Tabla 2. Resistencia y susceptibilidad de las poblaciones S1, R1 y R2 a seis herbicidas de distintos modos de acción.

Grupo HRAC	B	B	A	N	C2	K3 + F1
Herbicida	Iodosulfuron + Mesosulfuron	Pyroxsulam + Florasulam	Clethodim	Prosulfocarb	Clortoluron	Flufenacet + Diflufenican
S1	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible
R1	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Poco resistente
R2	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Poco resistente

### 3.2. Material vegetal

Con el fin de asegurar una etapa de crecimiento homogénea y reducir la variación debido a la latencia de las semillas, se trasplantaron plántulas pre-germinadas. Para ello, las semillas de estas poblaciones se hicieron germinar en Placas de Petri de 8,5 cm de diámetro. En la Placa de Petri se insertó una doble capa de papel de filtro estéril, y 30 semillas de *L. rigidum*. En todos los experimentos, inicialmente las placas de Petri preparadas se dejaron 7 días en cabina de crecimiento a 4°C en oscuridad, para su vernalización y facilitación de la germinación. Posteriormente se cambió a un programa de 10°C (12 horas en oscuridad) y 20°C (12 horas con luz) durante 14 días.

En placa se pusieron a germinar 210 semillas por población, distribuidas en 7 placas de Petri. La germinación en las semillas de la población S2 era muy elevada (aprox. 70%), las de R1 y R2 eran de una germinación de aproximadamente el 50%, y las de la S1 tenía muchos problemas de germinación con solamente un 15% de germinación y unas tasas de crecimiento muy lentas. Las plántulas germinadas, en estado fenológico BBCH 05-09 (Zadoks et al. 1974) se trasplantaron, 2 por maceta (constituyendo replicas), que contenían 2 partes de turba (2/9) y 7 partes de arena esterilizada (7/9) debidamente homogeneizadas.

### 3.3. Ensayos con herbicidas e inhibidores

Los experimentos que realizaron fueron:

- **Exp. PRE NBD-CI (B):** Estudio de la reversión de la resistencia en PRE-emergencia de *Lolium rigidum* Gland. al herbicida prosulfocarb mediante el inhibidor de GST, NBD-CI.
- **Exp. POST NBD-CI (A):** Estudio de la reversión de la resistencia en POST-emergencia de *Lolium rigidum* Gland. al herbicida prosulfocarb mediante el inhibidor del enzima GST, NBD-CI.
- **Exp. PRE Malatión (E)** Estudio de la reversión de la resistencia en PRE-emergencia de *Lolium rigidum* Gland. al herbicida prosulfocarb mediante el inhibidor de citocromo P450, Malatión.
- **Exp. POST Malatión (C)** Estudio de la reversión de la resistencia en POST-emergencia de *Lolium rigidum* Gland. al herbicida prosulfocarb mediante el inhibidor de citocromo P450, Malatión.
- **Exp. resistencia cruzada (D):** Estudio de resistencias a múltiples modos de acción de herbicidas en PRE-emergencia de *Lolium rigidum* Gland.

Los experimentos de PRE con NBD-CI y Malatión (B y E), fueron tratados con aplicación de inhibidor y herbicida prosulfocarb en post-emergencia precoz a plantas en estado BBCH 05-09 (Zadoks et al. 1974). A demás, en diversos experimentos no se trató con todas las dosis de prosulfocarb en la población S1 por falta de semillas suficientes.

#### Experimento PRE Prosulfocarb + NBD-Cl (B)

Se aplicó 1mL de inhibidor NBD-Cl en la placa de Petri. Después de 2 días se trasplantaron las semillas tratadas en macetas, y seguidamente se aplicó el herbicida prosulfocarb (Auros, Syngenta Agro, 80%) a tasas de dosis 1200, 2400 y 4800 g prosulfocarb ha<sup>-1</sup> (1,5, 3 y 6 L ha<sup>-1</sup>). Tras 7 semanas de desarrollo y crecimiento se cortó la parte aérea de las plántulas en estado fenológico BBCH13 y se pesó en una balanza de precisión el peso fresco de la parte aérea.

El NBD-Cl se preparó diluyendo el preparado de NBD-Cl con acetona en agua, 1% vol./vol. acetona en agua. La dosis de NBD-Cl fue escogida basándose en el estudio de NBD-Cl en *myosuroides* resistentes (Cummins et al. 2013).

#### Experimento POST Prosulfocarb + NBD-Cl (A)

Tras el trasplante en maceta se dejaron crecer durante 14 días y se aplicó inhibidor NBD-Cl en maceta, y tras 2 días se aplicó prosulfocarb a dosis 1600, 3200 y 6400 g prosulfocarb ha<sup>-1</sup> (2, 4 y 8 L prosulfocarb ha<sup>-1</sup>). Después de 2 semanas se realizó el corte y el peso fresco. La población S1 solo fue estudiada con aplicaciones de prosulfocarb a dosis de 1600 g ha<sup>-1</sup>.

#### Experimento PRE Prosulfocarb + Malatión (E)

Las semillas germinadas se trasplantaron en maceta donde se aplicó Malatión 1000 g ha<sup>-1</sup> (2 L ha<sup>-1</sup> –1600 g ha<sup>-1</sup>- malatión 50%), y 1 hora y 30 minutos después se aplicó el prosulfocarb a las dosis 1200, 2400 y 4000 g ha<sup>-1</sup> (1,5, 3 y 5 L ha<sup>-1</sup>). Tras 3 semanas se calculó el peso fresco. La población S1 solo fue estudiada con aplicaciones de prosulfocarb a dosis de 1200 y 2400 g ha<sup>-1</sup>.  
Nota: En este caso, no se aplicó el inhibidor en placa para evitar un exceso de fitotoxicidad.

#### Experimento POST Prosulfocarb + Malatión (C)

En el experimento C, después de 4 semanas del trasplante en macetas, se trató con Malatión a 1000 g ha<sup>-1</sup> y 1 hora después se aplicó prosulfocarb a dosis 800, 1600, 3200 y 4800 g ha<sup>-1</sup> (1, 2, 4 y 6 L ha<sup>-1</sup>). La población S1 solo fue estudiada con aplicaciones de prosulfocarb a dosis de 1600 y 3200 g ha<sup>-1</sup>.

Los experimentos A y C, de aplicación de inhibidor y herbicida prosulfocarb en post-emergencia a plantas en estado BBCH 12-13 (hay dos o tres hojas desarrolladas).

#### Experimento Herbicidas con diferentes modos de acción (D)

Se aplicaron PRE-herbicidas para entender los patrones de resistencia cruzada y múltiple. Tres días después del trasplante se aplicaron los distintos herbicidas. A las 4 semanas se calculó el peso fresco. Las tasas de dosis que se aplicaron a las poblaciones de *Lolium rigidum* fueron:

- Propizamida (Kerb Flo, 40% p/v), herbicida del grupo K1, a dosis de 375, 750 y 1500 g ha<sup>-1</sup> (0,938, 1,875 y 3,75 L ha<sup>-1</sup>).
- Clortoluron (Clorquat, 50% p/v), herbicida del grupo C2, a dosis de 750, 1500 y 2500 g ha<sup>-1</sup> (1,5, 3 y 5 L ha<sup>-1</sup>).
- Flufenacet (Belchim, 60% p/v), herbicida del grupo K3, a dosis 120, 240 y 480 g ha<sup>-1</sup> (0,2, 0,4 y 0,8 L ha<sup>-1</sup>).

Tabla 3. Resumen de las dosis de herbicida de cada experimento en las poblaciones S1, R1 y R2. El símbolo \* indica las dosis a las que no se aplicó a la población sensible S1 por falta de semillas.

Experimento		Tratamiento	Dosis				
PRE	B	Prosulfocarb +NBD-Cl	1200	2400	4800		g ha <sup>-1</sup>
		Prosulfocarb	1,5	3	6		L ha <sup>-1</sup>
	E	Prosulfocarb +Malatión	1200	2400	*4000		g ha <sup>-1</sup>
		Prosulfocarb	1,5	3	5		L ha <sup>-1</sup>
POST	A	Prosulfocarb +NBD-Cl	1600	*3200	*6400		g ha <sup>-1</sup>
		Prosulfocarb	2	4	8		L ha <sup>-1</sup>
	C	Prosulfocarb +Malatión	*800	1600	3200	*4800	g ha <sup>-1</sup>
		Prosulfocarb	1	2	4	6	L ha <sup>-1</sup>
PRE	D	Propizamida	375	750	1500		g ha <sup>-1</sup>
			0,938	1,875	3,75		L ha <sup>-1</sup>
		Clortoluron	750	1500	2500		g ha <sup>-1</sup>
			1,5	3	5		L ha <sup>-1</sup>
		Flufenacet	120	240	480		g ha <sup>-1</sup>
			0,2	0,4	0,8		L ha <sup>-1</sup>

### 3.4. Aplicaciones

La aplicación de herbicidas y el inhibidor de GST y P450 en maceta en los túneles de la ETSEA se realizó con una barra estática de precisión a 200 l/ha de caldo y una presión de 2 bares. Después del tratamiento las macetas estuvieron 24 horas en reposo en el invernadero, y posteriormente se regaron. El riego era 3 veces por semana.

El peso fresco de la parte aérea de las plantas se tomaron tras la cantidad de días después del tratamiento que fueron necesarios para ver y diferenciar los efectos de las aplicaciones de los químicos.

Tabla 4. Fechas en las que se inició el experimento A, B, C, D y E, la fecha de trasplante en maceta e inicio de desarrollo en túnel, fecha de aplicación de inhibidor y herbicida y fecha de fin del experimento y cálculo de peso fresco.

Experimento		Inicio germinación	Trasplante a maceta	Aplicación inhibidor	Aplicación herbicida	Final	Trasplante - herbicida	Herbicida - fin
A	POST - NBD-Cl	14 febrero	7 marzo	19 marzo	21 marzo	11 abril	2 semanas	3 semanas
B	PRE - NBD-Cl	28 febrero	21 marzo	19 marzo	21 marzo	6 mayo	-	6,57 semanas (46 días)
C	POST - Malatión	14 marzo	4 abril	2 mayo	2 mayo + 1h	23 mayo	4 semanas	3 semanas
D	PRE R. cruzada	29 marzo	29 abril	-	2 mayo	28 mayo	3 días	3,71 semanas (26 días)
E	PRE - Malatión	4 abril	14 mayo	22 mayo	22 mayo + 1h	12 junio	1 semana	3 semanas

Hubo cuatro o cinco macetas replicadas por dosis de herbicida y la maceta individual representaba la unidad experimental (Nota: la cantidad de réplicas de algún experimento fue disminuido debido al número limitado de semillas).

Los experimentos se realizaron en distintos momentos del año, desde febrero a junio (Tabla 4), lo que podría haber variado las condiciones climáticas en el túnel de un experimento a otro. Se podrían diferenciar los experimentos A, B y C, que estuvieron durante los meses de abril e inicios de mayo a una temperatura de 11,2°C diarios de media, de los experimentos D y E que se realizaron a finales de mayo y junio, con temperaturas de 18,1°C diarios de media (Tabla 5). Esta diferencia de temperaturas podría haber afectado al crecimiento de las plantas, ya que es una mala hierba de invierno, o a la actuación del herbicida o el inhibidor.

Tabla 5. Datos meteorológicos de la etapa del experimento en invernadero desde el día del trasplante de semillas germinadas hasta el fin del experimento, día del cálculo de peso fresco.

Experimento		Media Tª diaria (Cº)	Media Humedad relativa diaria	Media Precipitación acumulada diaria	Irradiación solar global diaria
A	POST - NBD-CI	11,172	62,1538	0,3256	18,779
B	PRE - NBD-CI	10,688	63,588	0,3176	18,441
C	POST - Malatión	14,498	62,56	0,666	23,042
D	PRE R. cruzada	16,27	61,6	1,007	26,157
E	PRE - Malatión	18,1267	56,967	1,047	26,743

### 3.5. Kit BReD

Los pasos a seguir para llevar a cabo el test de detección rápido *in vivo* de resistencias por metabolismo aumentado a herbicidas son, cortar unos 3 cm de hoja verde de *Lolium rigidum*, y triturarlos a trozos pequeños con la ayuda de tijeras. Se añaden los trozos de hoja en una botella con Buffer de Extracción y tres bolas metálicas, y cerrar la botella. Se agita tan vigorosamente como sea posible la botella con el buffer y los trozos de hoja durante 30 segundos, para obtener un perfecto triturado y homogeneizado extracto vegetal.

Luego se añaden 3 gotas del extracto vegetal en el agujero del dispositivo *Lateral Flow Device*. La aparición de una primera línea rojiza, como control, indica que el LFD funciona correctamente. En caso de que la línea control no se marque, el análisis será inválido y deberá repetirse (Figura 6).



Figura 6. Caja del Kit BReD utilizada en el estudio.

Tras 5 minutos de reacción, se comprueba la aparición de la segunda línea de la prueba y se cuantifica la intensidad en el Lector de intensidad del Kit, Cube Reader. En el caso de la aparición de la segunda banda, indica que la planta es resistente al herbicida, por el contrario, si no aparece ninguna banda o es una banda de muy baja intensidad, indica que la planta no presenta resistencia NTRS y, por lo tanto, es sensible al herbicida siendo el herbicida efectivo al ser aplicado en campo.

#### 3.5.1. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Para confirmar los resultados del LFD, se cuantificó la concentración de *LrGSF1* por ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con 5 réplicas biológicas de cada población (cada replica obtenida de un conjunto de 4 plantas). La proteína total fue extraída de tejido de la parte aérea de las plántulas y sujeta a ELISA usando los mismos anticuerpos específicos que en el LFD.



### 3.6. Parámetros analizados

Para determinar la viabilidad de las plantas después de la aplicación del herbicida, en el experimento A, se esperó durante 6 semanas el rebrote de las hojas cortadas. Si no rebrotaban, la planta estaba muerta en el momento de realizar el peso seco, si rebrotaban estaban vivas, y, por tanto, el herbicida o el inhibidor de GST no causa la muerte a la planta.

En el resto de los experimentos (Exp B, C, D y E), la supervivencia a la aplicación del herbicida fue determinada teniendo como criterio el estado de la parte aérea de la planta. De forma visual se clasificaron como muertas o en senescencia las plantas que estaban secas y de color marrón o amarillento. En caso de estar vivas, presentan un color amarillento-verdoso (debido a la toxicidad, aunque no mortalidad del herbicida). La determinación fue tomada el mismo día que el de la estimación del peso fresco de las plántulas (Tabla X).

Las ecuaciones aplicadas para los porcentajes de supervivencia y de reducción del peso fresco respecto al testigo no tratado fueron:

$$\text{Porcentaje de supervivencia} = \frac{n^{\circ} \text{ plantulas vivas (0,1 o 2)}}{2} * 100$$

$$\text{Porcentaje de reducción del Peso Fresco} = \frac{100 - \text{Peso Fresco (replica}_x\text{)}}{\text{Peso Fresco testigo sin tratar (promedio)}} * 100$$

Donde x= réplica 1, 2, 3... n

La lectura de intensidad de la banda en el Kit BReD de blackgrass indican que si resulta un valor de 20 (aproximadamente), se trata de una planta sensible. Si resulta en un valor de 40 (aproximadamente) se trata de una planta resistente.

Las muestras del ensayo de las poblaciones S1, R1, R2, VLR69 y SLR31, para hacer el test LFD y el ELISA, para conocer la variación entre poblaciones, se obtuvo de 20 cortes de hoja (~0.7 cm/corte) de 20 plantas individuales, juntadas en un pool.

### 3.7. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de reducción del peso fresco respecto al testigo no tratado (%) y la supervivencia (%) se realizaron mediante ANOVA. En los ensayos con inhibidores, el efecto en la respuesta a las aplicaciones de los tratamientos se realizó utilizando una ANOVA de tres factores fijos: población, dosis de prosulfocarb y presencia o no de inhibidores de enzima. En los ensayos de las resistencias cruzadas se usó ANOVA de dos factores: población y dosis de herbicida. Si el factor es significativo en el nivel  $\alpha=0,05$ , se rechazó la hipótesis nula de que los grupos tienen medias iguales. Se utilizó el test LSD (diferencia mínima de los cuadrados) para establecer la diferencia entre las medias de las muestras ( $P<0.05$ ).

Se analizaron los resultados de supervivencia y peso fresco teniendo en cuenta tanto la población sensible como no, ya que debido a su escasez de semillas no se pudieron aplicar todas las dosis deseadas (con o sin inhibidor). Por eso, se hicieron análisis mediante ANOVA con las tres poblaciones (S1, R1 y R2), y considerando solo las dosis coincidentes, y, por otro lado, análisis ANOVA con las poblaciones resistentes (R1 y R2), ya considerando todas ellas. El

análisis sin la población sensible S1 nos permite comparar y ver mayores diferencias entre poblaciones resistentes en la aplicación de prosulfocarb a diferentes dosis y con la aplicación del inhibidor de P450 o no.

Los datos obtenidos de los experimentos no siguieron la normalidad, aunque si la homocedasticidad. Los datos sobre el porcentaje de reducción de peso fresco y de supervivencia se transformaron ( $\arcsen \sqrt{x/100}$ ) antes del análisis. Los análisis estadísticos de la biomasa reducida (%) y la supervivencia (%) se realizaron mediante el software estadístico JMP Pro v.14 (SAS Institute, Cary, NC).

Los datos obtenidos del Kit BReD y de la ELISA no fueron sujetos a análisis estadísticos y únicamente se muestran medianas y errores estándar.

## 4. Resultados

### 4.1. Reversión de las resistencias

#### 4.1.1 Experimento PRE NBD-Cl (B)

El análisis de la varianza del experimento B de pre-emergencia del prosulfocarb con aplicación de NBD-Cl como inhibidor de la GST fue significativo, y mostró que los factores población de *Lolium* y dosis de herbicida fueron significativos, en cambio, no lo fue el factor inhibidor (Tabla 6.a). Además, sólo la interacción entre población y dosis fue significativa. La población S1 fue significativamente más sensible al herbicida que las R1 y la R2 a la dosis más baja. En cambio, aunque las dosis de 4800 y 2400 g ha<sup>-1</sup> redujeron el peso fresco más que a 1200 g ha<sup>-1</sup>, no mostraron diferencias entre las tres poblaciones porque siempre se superó el 99% de reducción del peso fresco.

Tabla 6. Reducción del peso fresco al aplicar prosulfocarb en pre-emergencia en placa de Petri y NBD-Cl. Análisis de las poblaciones S y R (a) y de las poblaciones solo de las resistentes (b).

	Malatión	a. Análisis de poblaciones S y R			b. Análisis de poblaciones R	
		Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
		S1 B	R1 A	R2 A	R1 A	R2 A
1200 g ha <sup>-1</sup> B	-	98,1 ± 3,8 ab	69,4 ± 29,7 d	84,4 ± 18,0 cd	69,4±29,7 c	84,4±18 bc
	+	100 ± 0 a	82,8 ± 17,6 cd	87,6 ± 13,6 bc	82,8±17,6 bc	87,6±13,6 b
2400 g ha <sup>-1</sup> A	-	100 ± 0 a	99,4 ± 1,4 a	100 ± 0 a	99,4±1,3 a	100±0 a
	+	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100±0 a
4800 g ha <sup>-1</sup> A	-	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100±0 a
	+	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100±0 a
		ANOVA	<,0001*		ANOVA	<,0001*
		Población	0,0134*		Población	0,3176
		Inhibidor 450	0,3183		Inhibidor 450	0,3863
		Dosis	<,0001*		Dosis	<,0001*
		Población *450	0,7458		Población *450	0,5315
		Población *Dosis	0,0049*		Población *Dosis	0,4965
		450* Dosis	0,4861		450* Dosis	0,6085
		Población*450* Dosis	0,9589		Pob*450* Dosis	0,8039

En el análisis de varianza únicamente con las poblaciones resistentes, el factor dosis fue el único factor significativo que presenta diferencias entre algunas de las medias (Tabla 6.b). Las dos poblaciones de *Lolium* resistente tienen un comportamiento igual delante de la aplicación del prosulfocarb y NBD-Cl en pre-emergencia.

No se observaron diferencias significativas entre aplicar inhibidor o no, aunque se observaba una mayor reducción del peso fresco cuando el herbicida a dosis 1200 g ha<sup>-1</sup> se aplicó juntamente con el inhibidor de GST, sobre todo para la población R1. A dosis mayores de 1200 g ha<sup>-1</sup> todas las plantas (sensibles o resistentes) redujeron su peso al 100% con o sin aplicación del NBD-Cl.

#### 4.1.2. Experimento POST NBD-Cl (A)

El análisis de la varianza del experimento A de las poblaciones sensible y resistentes, de post-emergencia del prosulfocarb con aplicación de NBD-Cl como inhibidor de la GST fue significativo, y mostró que los factores población de *Lolium* y dosis de herbicida fueron significativos, en cambio, no lo fue el factor NBD-Cl (anexo 3.1). También fue significativo la interacción población\*dosis. Los mismos resultados se obtuvieron al hacer el análisis solo con las poblaciones resistentes.

Tanto en el análisis de la varianza con la población sensible y resistentes como con solo las poblaciones resistentes, se mostraban diferencias significativas entre las plantas con tratamiento de prosulfocarb (dosis 1600, 3200 y 6400 g/ha), que presentan todas un 0% de supervivencia, con las no tratadas (control) que presentaban mayor porcentaje de supervivencia. La población sensible S1 y resistente R2 sin tratar presentan altas tasas de supervivencia, mayores del 85%, y la R1 presenta un porcentaje significativamente menor, con un 40% de media.

El análisis de la variancia del porcentaje de la reducción de peso de las poblaciones S, R1 y R2 fue significativo (anexo 3.2). Los factores población y NBD-Cl analizados fueron significativos, pero no su interacción. La población S1 se observa menos susceptible a prosulfocarb que las poblaciones resistentes, y a dosis 1600 g ha<sup>-1</sup>, la aplicación de NBD-Cl tiene un efecto de aumento de la reducción de peso.

Al hacer el análisis con las poblaciones resistentes únicamente, el análisis de la varianza continúa siendo significativo. Ningún factor fue significativo per su lo fueron las interacciones Pob\* NBD-Cl y Población \*Dosis.

#### 4.1.3. Experimento PRE Malatión (E)

El análisis de la varianza de la supervivencia de las poblaciones de vallico susceptible y resistentes del experimento E con aplicación de malatión y prosulfocarb en PRE-emergencia fue significativo. El factor dosis y población fueron significativos, por otra parte, el factor inhibidor o las interacciones no lo fueron (Tabla 7.a).

El porcentaje de supervivencia de la población sensible es significativamente inferior que el de las poblaciones resistentes. En cuanto a dosis de prosulfocarb, la dosis de 1200 g ha<sup>-1</sup> y 2400 g ha<sup>-1</sup> redujeron significativamente la supervivencia de *Lolium* resistente con hasta un 30% de supervivencia, en comparación con las plantas no tratadas.

La dosis 2400 g ha<sup>-1</sup> juntamente con el inhibidor de P450 es el tratamiento que produce más mortalidad en la población sensible S1, con una completa mortalidad, en comparación con las poblaciones resistente que llegan a tener una media del 70% de mortalidad (sin inhibidor).

Aunque el factor inhibidor no sea significativo, tiene un claro efecto sobre la supervivencia en las poblaciones resistentes. Se puede observar cómo en dosis de 1200 y 2400 g ha<sup>-1</sup>, al aplicar malatión, el porcentaje de supervivencia aumenta. Por el contrario, en dosis de 4000 g ha<sup>-1</sup>, en la población R1, este efecto es el inverso, reduciendo más la supervivencia en presencia del inhibidor.

Tabla 7. Porcentaje de supervivencia de las poblaciones sensible S1 y resistentes R1 y R2 en pre-emergencia con aplicación de malatión y prosulfocarb. Análisis de las poblaciones S y R (a) y de las poblaciones solo de las resistentes (b).

		a. Análisis de poblaciones S y R			b. Análisis de poblaciones R	
	Malatión	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
		S1 B	R1 A	R2 A	R1 A	R2 A
0 g ha <sup>-1</sup> A	-	100±0 a	100±0 a	100±0 a	100±0 a	100±0 a
	+	100±0 a	100±0 a	100±0 a	100±0 a	100±0 a
1200 g ha <sup>-1</sup> B	-	12,5±25 cd	30±44,72 cd	40±41,83 bc	30±44,72 cd	40±41,8 bcd
	+	12,5±25 cd	50±40,82 bc	70±27,39 ab	50±40,82 bc	70±27,4 ab
2400 g ha <sup>-1</sup> B	-	12,5±25 cd	30±27,39 cd	30±27,39 cd	30±27,39 cd	30±27,4 cd
	+	0±0 d	40±41,83 bc	50±50 bc	40±41,83 bcd	50±50 bc
4000 g ha <sup>-1</sup> C	-				37,5±3 bcd	10±22,4 d
	+				10±22,4 d	10±22,4 d

ANOVA	<,0001*
Población	0,0058*
Inhibidor 450	0,2391
Dosis	<,0001*
Población *450	0,4054
Población *Dosis	0,2171
450* Dosis	0,5564
Población*450* Dosis	0,9204

ANOVA	<,0001*
Población	0,8190
Inhibidor 450	0,3383
Dosis	<,0001*
Población *450	0,3859
Población *Dosis	0,5188
450* Dosis	0,2114
Pob*450* Dosis	0,9134

En el análisis de varianza únicamente con las poblaciones resistentes, el factor dosis fue el único factor que presenta diferencias entre algunas de las medias, siendo estadísticamente significativo (Tabla 7.b). La dosis de prosulfocarb de 4000 g ha<sup>-1</sup> fue la que más redujo la supervivencia en las dos poblaciones de vallico resistente, con hasta un 10% de supervivencia en las dos poblaciones con inhibidor, y en R2 sin inhibidor.

El análisis de la variancia del porcentaje de la reducción de peso de las poblaciones S, R1 y R2 fue significativo, y mostró que el factor dosis era significativo. A demás, la interacción población y dosis fue la única que resultó significativa (Tabla 8.a). A dosis 2400 g de prosulfocarb ha<sup>-1</sup> se da una reducción significativamente mayor que a 1200 g ha<sup>-1</sup> en S1 y R2. La interacción dosis\*población (p=0,0003) muestra como la población R1 presenta una reducción de peso muy elevada a todas las dosis, siempre mayor del 86%, por otro lado, las poblaciones S1 y R2 al aplicarse dosis baja (1200 g ha<sup>-1</sup>) presentan bajas reducciones de peso (entre el 66 y 80%), mientras que a mayor dosis (2400 g ha<sup>-1</sup>) consiguen tener en todos los casos más del 90% de reducción de peso.

Tabla 8. Porcentaje de reducción del peso fresco de la parte aérea en la aplicación de PRE-emergencia en las poblaciones sensible S, y resistentes R1 y R2.

Dosis	Malatión	a. Análisis de poblaciones S y R						b. Análisis de poblaciones R			
		Sensible		Resistente		Resistente		Resistente		Resistente	
		S1	AB	R1	A	R2	B	R1	A	R2	B
1200 g ha <sup>-1</sup> B	-	69,5±7,6	c	95,33±5,6	a	79,78±18	bc	95,33±5,5	a	79,78±18,1	b
	+	67,33±7,6	c	88,68±9	ab	66,45±23,4	c	90,4±9,4	ab	66,45±23,4	c
2400 g ha <sup>-1</sup> A	-	100±0	a	91,46±4,3	ab	91,88±6,8	ab	91,46±4,3	ab	91,88±6,8	ab
	+	100±0	a	86,88±9,5	ab	91,12±6,3	ab	85,87±8,5	ab	91,12±6,3	ab
4000 g ha <sup>-1</sup> A	-							91,98±1,4	ab	94,33±3,6	a
	+							96,46±2,7	a	92,27±6,6	ab
		ANOVA		<,0001*		ANOVA		0,0022*			
		Población		0,0684		Población		0,0333*			
		Inhibidor 450		0,1539		Inhibidor 450		0,1788			
		Dosis		<,0001*		Dosis		0,0082*			
		Población *450		0,7491		Población *450		0,5373			
		Población *Dosis		0,0003*		Población *Dosis		0,0030*			
		450* Dosis		0,3796		450* Dosis		0,3108			
		Población*450* Dosis		0,7146		Población*450* Dosis		0,5568			

En el análisis de las poblaciones resistentes únicamente, también resultó significativo el factor población, donde la población R1 consigue un mayor porcentaje de reducción que R2 (Tabla 8.b). Esta diferencia se debe principalmente a la dosis 1200 g ha<sup>-1</sup>, ya que la población R2 se muestra más resistente que R1. En cuanto a dosis, la aplicación de 2400 y 4000 g de prosulfocarb ha<sup>-1</sup> son significativamente más eficaces para reducir el peso que a 1200 g ha<sup>-1</sup>. La interacción de dosis\*población es significativa, ya que R1 y R2 a todas las dosis tiene una reducción de peso de más del 89%, excepto en la población R2 a dosis baja 1200 g ha<sup>-1</sup> donde se da una reducción del 73%.

Aunque el inhibidor de P450 no sea un factor significativo, se observa una tendencia de menor porcentaje de reducción de peso en las plantas que han sido tratadas con malatión (entre un 2 y una 13%), es decir, al aplicar malatión las plántulas son más grandes que las que solo están tratadas con prosulfocarb.

#### 4.1.4. Experimento POST Malatión (C)

El análisis de la varianza de las poblaciones S y R, del experimento C de post-emergencia del prosulfocarb con aplicación de Malatión como inhibidor de la P450 fue significativo ( $p < 0.0001$ ), y mostró que los tres factores población de *Lolium*, malatión y dosis de herbicida fueron significativos (Tabla 9.a). Además, las interacciones entre población\*dosis y población\*malatión fueron significativas.

Ambas poblaciones resistentes, con hasta un 80% de supervivencia, resisten mucho mejor al herbicida que la sensible, con una supervivencia de hasta un 16,7%. Además, la dosis más efectiva es a 3200 g ha<sup>-1</sup> seguida de la aplicación de 1600 g ha<sup>-1</sup>. En cuanto a la eficacia del malatión, la aplicación juntamente con prosulfocarb redujo significativamente la supervivencia de *Lolium* en comparación con el tratado únicamente con prosulfocarb (sin malatión).

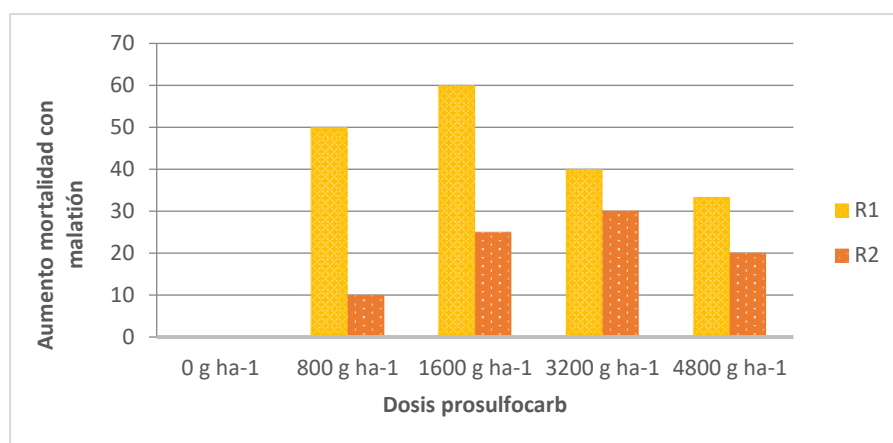
En la interacción de población\*malatión se observa como las poblaciones R1 y R2 sin malatión presentan resistencia y un elevado porcentaje de supervivencia (entre el 70 y 80% de media). En cambio, al aplicar el herbicida con malatión, se reduce la resistencia y el porcentaje de supervivencia es mucho menor (del 39 al 47% de media). La supervivencia de la población sensible, por otro lado, no se ve afectada significativamente por el malatión (alrededor del 37% de supervivencia con y sin malatión).

Tabla 9. Porcentaje de supervivencia de las poblaciones resistentes R1 y R2 y sensible S1, en post-emergencia con aplicación de malatión y prosulfocarb.

Dosis herbicida	Malatión	a. Análisis de poblaciones S y R			b. Análisis de poblaciones R	
		Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
		S1 B	R1 A	R2 A	R1 A	R2 A
0 g ha <sup>-1</sup> A	-	100±0 a	100±0 a	100±0 a	100±0 a	100±0 a
	+	100±0 a	100±0 a	100±0 a	100±0 a	100±0 a
800 g ha <sup>-1</sup> B	-				100±0 a	80±27,4 bc
	+				50±50 def	70±27,4 cd
1600 g ha <sup>-1</sup> B	-	10±22,36 e	80±27,39 ab	75±28,87 ab	80±27,4 bc	75±28,9 cd
	+	16,7±28,9 de	20±27,39 de	50±40,82 bcd	20±27,4 fg	50±40,8 def
3200 g ha <sup>-1</sup> C	-	0±0 e	60±41,8 bc	40±22,36 cd	60±41,8 cde	40±22,4 ef
	+	0±0 e	20±44,7 de	10±22,36 e	20±44,7 f	10±22,4 g
4800 g ha <sup>-1</sup> C	-				50±35,4 def	30±27,4 fg
	+				16,67±28,9 f	10±22,36 g
		ANOVA	<,0001*		ANOVA	<,0001*
		Población	0,0002*		Población	0,6022
		Inhibidor 450	0,0025*		Inhibidor P450	<,0001*
		Dosis	<,0001*		Dosis	<,0001*
		Población *450	0,0282*		Población *450	0,1035
		Población *Dosis	0,0147*		Población *Dosis	0,5845
		450* Dosis	0,0848		450* Dosis	0,1940
		Población*450* Dosis	0,3166		Población*450* Dosis	0,7983

Al hacer el análisis solo con las poblaciones resistentes, los factores Malatión y dosis fueron significativos, no siéndolo el factor población o las interacciones entre factores (Tabla 9.b). Las dosis de 3200 y 4800 g de prosulfocarb ha<sup>-1</sup> son las más efectivas para obtener una mayor mortalidad de *Lolium*, seguida de las dosis de 800 y 1600 g de prosulfocarb ha<sup>-1</sup>, que son significativamente más efectivas en comparación con el no-tratamiento.

Entre poblaciones, tal y como se observa en la Gráfica 1 y Figura 7, la población R1 se muestra más resistente que la R2 en todas las dosis de herbicida, con una diferencia de un 20% de supervivencia más en R1, excepto en la dosis 1600 g ha<sup>-1</sup> con solo un 5% más. Se observa una mayor resistencia con una supervivencia del 100% y el 80% a dosis 800 g ha<sup>-1</sup>, y la menor en dosis de 4800 g ha<sup>-1</sup> con el 50% y el 30%, en R1 y R2 respectivamente. Al aplicar malatión, la mayor diferencia se encuentra en R1 al aplicar 1600 g de prosulfocarb ha<sup>-1</sup> aumentando un 60% la mortalidad. También es muy significativa la diferencia a 3200 g de prosulfocarb ha<sup>-1</sup>, consiguiendo aumentar un 40% la mortalidad y un 30% en la población R2.



Gráfica 1. Diferencia del porcentaje de la mortalidad entre la aplicación de prosulfocarb más malatión respecto a aplicación única de prosulfocarb (sin malatión), en las poblaciones resistentes R1 y R2 en post-emergencia, obtenida de la resta de medias del porcentaje de supervivencia de plantas tratadas con malatión menos la media del porcentaje de reducción de supervivencia de las plantas no tratadas con malatión.

El análisis de la variancia del porcentaje de la reducción de peso de las poblaciones S, R1 y R2 no es significativo, y mostró que el factor dosis sí era significativo. A demás, la interacción población\*malatión fue la única que resultó significativa (Tabla 10.a), donde se observa que el malatión en R2 y R1 aumenta la reducción de peso en comparación a la aplicación de prosulfocarb sólo, en cambio, en S1 no tiene un efecto aparente.

Tabla 10. Porcentaje de reducción del peso fresco de la parte aérea de las poblaciones resistentes R1 y R2 y sensible S1, en post-emergencia con aplicación de malatión y prosulfocarb.

Dosis herbicida	Malatión	a. Análisis de poblaciones S y R						b. Análisis de poblaciones R			
		Sensible		Resistente		Resistente		Resistente		Resistente	
		S1	A	R1	A	R2	A	R1	A	R2	A
800 g ha <sup>-1</sup> C	-							12,4±14,54	e	39,4±13,7	cd
	+							28,4±27,7	de	22±21,5	e
1600 g ha <sup>-1</sup> B	-	56,13±35,9	cd	34,1±22,4	d	45,7±27,4	cd	34,1±22,4	de	45,7±27,4	cd
	+	51,9±45,8	cd	74,6±15,2	b	64,5±8,5	c	74,6±15,2	ab	65,7±9,3	bc
3200 g ha <sup>-1</sup> AB	-	90±7,73	a	42,3±31,4	cd	72±29,2	bc	42,3±31,4	cd	72±29,2	ab
	+	73,6±3,6	bc	79,8±12,3	ab	71,8±19	bc	79,8±12,31	a	69,4±17,3	b
4800 g ha <sup>-1</sup> A	-							68,1±35,6	b	81,9±10,76	a
	+							73,8±9,5	ab	73,6±16,2	ab
		ANOVA					0,0509	ANOVA			
		Población					0,5503	Población			
		Inhibidor 450					0,1559	Inhibidor P450			
		Dosis					0,0186*	Dosis			
		Población *450					0,0171*	Población *450			
		Población *Dosis					0,4223	Población *Dosis			
		450* Dosis					0,4971	450* Dosis			
		Población*450* Dosis					0,9565	Pob*450* Dosis			



El análisis solo con las poblaciones resistentes sí fue significativo (Tabla 10.b). El factor dosis y la interacción población\*malatión fueron significativos, igual que en el análisis con sensible incluida. La dosis a la que se obtiene una reducción mayor del peso de la parte aérea es a 4800 g ha<sup>-1</sup>, seguida de 3200 y 1600 g ha<sup>-1</sup>. Con la dosis más baja, a 800 g ha<sup>-1</sup> se obtienen reducciones de peso significativamente menores que a dosis altas. La interacción del inhibidor de P450 y población indica que el malatión en la población R1 tiene un efecto sinérgico en la reducción de peso, mientras que en R2 no tiene un efecto significativo.

Aunque el malatión no sea un factor significativo, se observa una reducción mayor en el peso al aplicar malatión, que al no aplicarlo juntamente con el prosulfocarb. Los efectos de reversión de la resistencia por malatión se observan únicamente en la población R1, con mayor diferencia a dosis 1600 g de prosulfocarb ha<sup>-1</sup> pasando del 34,1% de reducción de peso a un 74,6% y a 3200 g ha<sup>-1</sup> de 42,3 al 79,8%. Aunque en menor medida, también mejora el efecto del prosulfocarb a la dosis máxima y mínima aplicada juntamente con Malatión. En R2 solo se sigue esta tendencia a dosis 1600 g de prosulfocarb ha<sup>-1</sup>, mientras que en las demás dosis el uso de Malatión disminuyendo el porcentaje de reducción del peso.

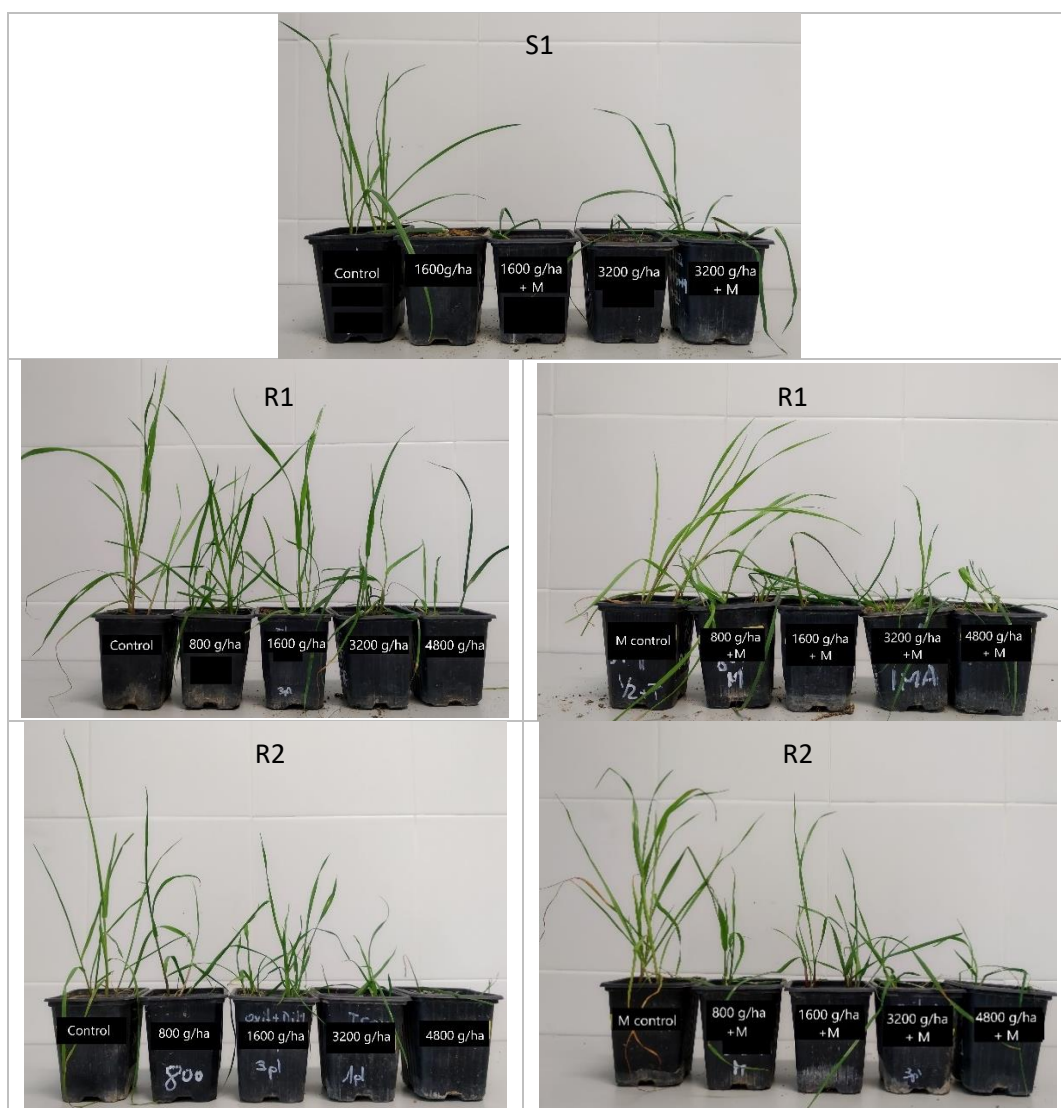
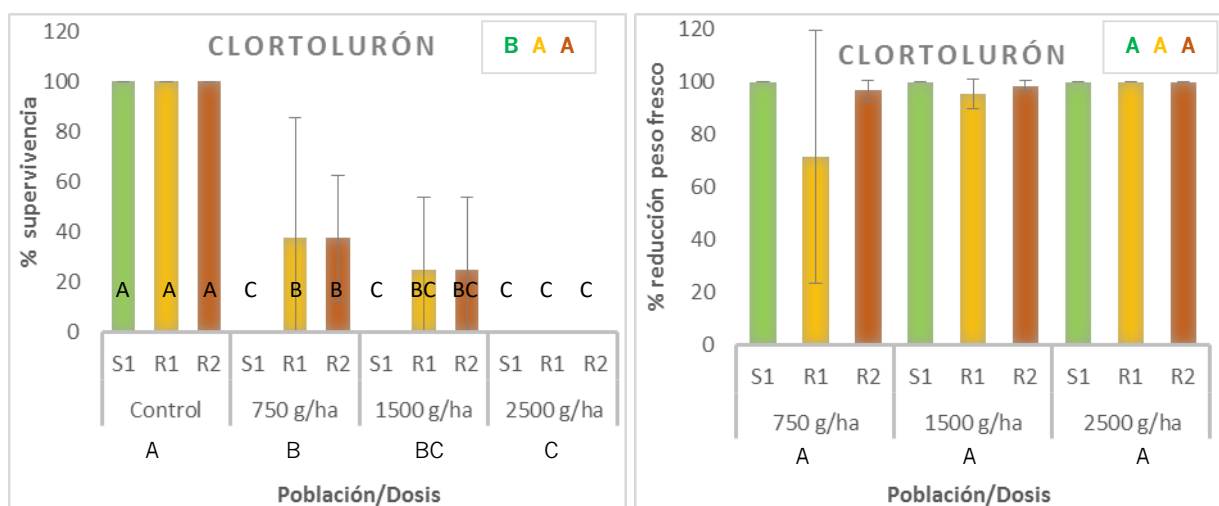


Figura 7. Plantas de *Lolium rigidum* de las poblaciones S1, R1 y R2 tratadas en post-emergencia con prosulfocarb (dosis indicada en g/ha) y con malatión (M) y sin tratamiento de herbicida (control).

## 4.2. Resistencia múltiple y cruzada

El análisis de la varianza del porcentaje de supervivencia de las poblaciones al aplicar el herbicida clortolurón (HRAC C2) fue significativo (anexo 3.3). A demás, muestra que el factor dosis es el único factor significativo (gráfica 2.a). La dosis de 2500 g de clortolurón  $\text{ha}^{-1}$  afecta significativamente más a la supervivencia con un 100% de mortalidad en todas las poblaciones, seguida de la dosis 750 g  $\text{ha}^{-1}$  con supervivencias del 40%, e inferiores al 25% a dosis 1500 g  $\text{ha}^{-1}$ , en las poblaciones R1 y R2. A todas las dosis, la población S1 presenta una mortalidad del 100% y las plántulas sin tratamiento presentan siempre una supervivencia del 100%.

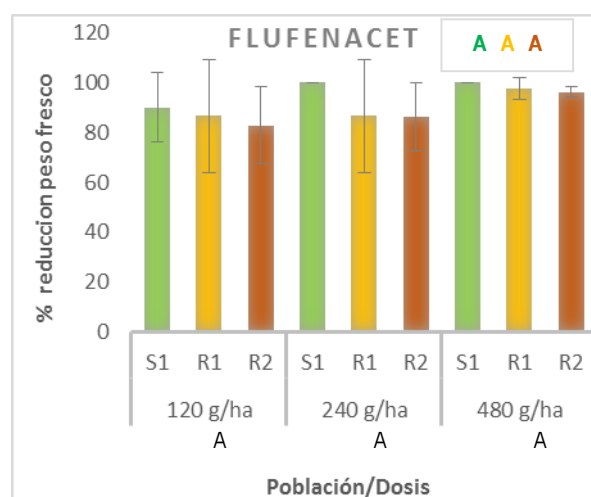
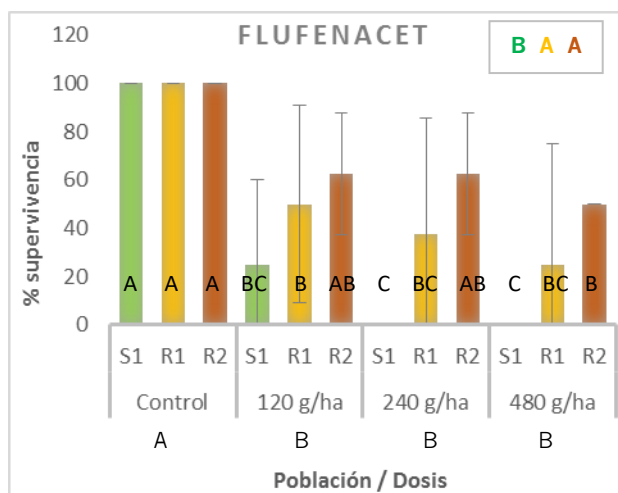


Gráfica 2.a (izquierda). Porcentaje de supervivencia de las poblaciones S1, R1 y R2 al aplicar el herbicida clortolurón (HRAC C2) en pre-emergencia. Gráfica 2.b (derecha). Porcentaje de reducción de peso fresco de las poblaciones S1, R1 y R2 al aplicar el herbicida clortolurón (HRAC C2) en pre-emergencia. Letras en la parte superior derecha representan la significancia entre poblaciones (verde S1, amarillo R1 y marrón R2), letras en la parte inferior representan la significancia entre dosis y letras sobre las columnas representan la significancia entre las poblaciones\*dosis.

En cuanto al porcentaje de reducción del peso fresco, el análisis de la varianza no es significativo y tampoco los factores (gráfica 2.b). En todas las poblaciones y a todas las dosis se obtuvo una reducción de aproximadamente el 100%.

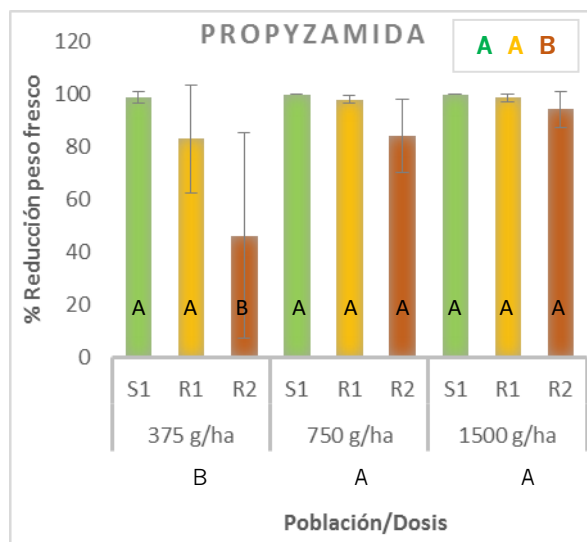
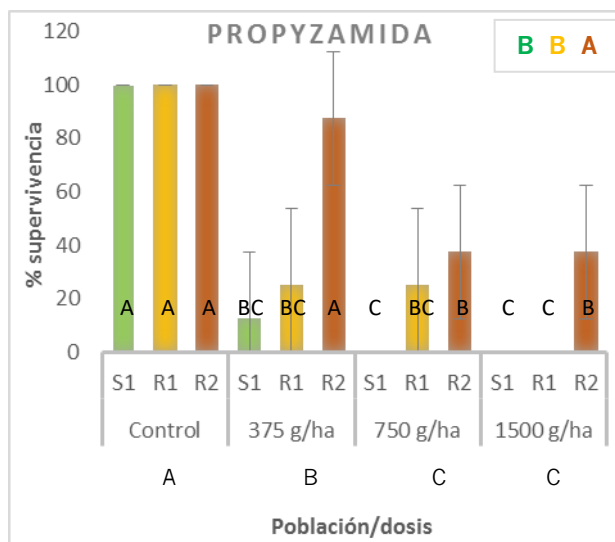
El análisis de la varianza del porcentaje de supervivencia de las poblaciones al aplicar el herbicida **flufenacet** (HRAC K3) fue significativo y mostró que hay diferencias significativas en los factor población y dosis (gráfica 3.a). Con aplicación de flufenacet las poblaciones resistentes a prosulfocarb sobreviven más que no la sensible, y las diferentes dosis de flufenacet provocan porcentajes de supervivencia similares, con porcentajes de entre el 25 y 50% en R1 y entre 50 y 63% en R2. La sensible S1 presentó un 25% de supervivencia a dosis más baja y del 0% a mayores dosis.

En cuanto al porcentaje de reducción del peso fresco, ni el análisis de varianza ni ningún factor fueron significativos. Aunque no significativamente, la población S1 reduce más su biomasa que R1 y R2, que muestra mayor peso en las tres dosis de herbicida (gráfica 3.b).



Grafica 3.a. (izquierda) Porcentaje de supervivencia de las poblaciones S1, R1 y R2 al aplicar el herbicida flufenacet (HRAC K3) en pre-emergencia. Grafica 3.b. (derecha). Porcentaje de reducción de peso de las poblaciones S1, R1 y R2 al aplicar el herbicida flufenacet (HRAC K3) en pre-emergencia. Letras en la parte superior derecha representan la significancia entre poblaciones (verde S1, amarillo, R1 y marrón R2), letras en la parte inferior representan la significancia entre dosis) y letras sobre las columnas representan la significancia entre las poblaciones\*dosis.

Tanto el factor población, dosis, como la interacción de ambas fueron significativas en el análisis de varianza del porcentaje de supervivencia al aplicar el herbicida **propizamida** (HRAC K1). La población R2 es significativamente más resistente a propizamida que R1 y S1, y las dosis de 750 y 1500 g ha<sup>-1</sup> causan mayor mortalidad que la dosis 375 g ha<sup>-1</sup> (gráfica 4.a.).

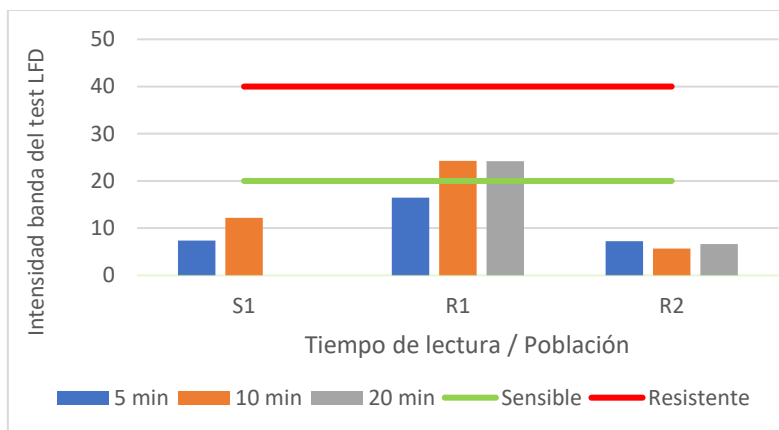


Grafica 4.a (izquierda). Porcentaje de supervivencia de las poblaciones S1, R1 y R2 al aplicar el herbicida propizamida (HRAC K1) en pre-emergencia. Grafica 4.b (derecha). Porcentaje de reducción de peso fresco de las poblaciones S1, R1 y R2 al aplicar el herbicida propizamida (HRAC K1) en pre-emergencia. Letras en la parte superior derecha representan la significancia entre poblaciones (verde S1, amarillo, R1 y marrón R2), letras en la parte inferior representan la significancia entre dosis) y letras sobre las columnas representan la significancia entre las poblaciones\*dosis.

El análisis del porcentaje de reducción del peso fresco con la aplicación de Propizamida fue significativo (gráfica 4.b). Se muestran diferencias significativas en los factores población y dosis, pero no en su interacción. La población R2 fue la más resistente al herbicida con una menor reducción del peso, con hasta un porcentaje de reducción del 46%, en cambio, R1 tiene una susceptibilidad similar a S1, con reducciones mayores del 83% y del 99%, respectivamente.

#### 4.3. Tecnologías de detección de resistencias a herbicidas en malas hierbas

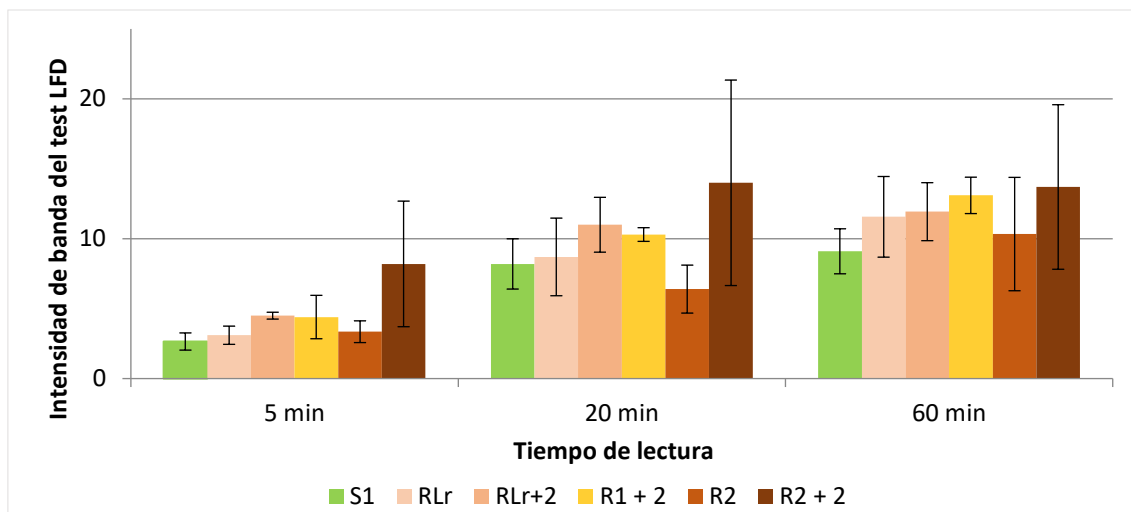
Un primer ensayo para conocer de forma rápida como son los niveles aproximados de la proteína GST con el test LFD (Kit BReD) mostraron diferencias entre las poblaciones en la intensidad de la banda, siendo la población resistente a prosulfocarb R1 la más intensa, con un valor de 20,35 de media. Después se encuentran las poblaciones sensibles S1. Y por último la población R2 con una intensidad media de 6,1 (gráfica 5).



Gráfica 5. Primer ensayo de determinación de resistencia mediante la intensidad de la banda del test el test LFD de las poblaciones sensibles S1, y resistentes R1 y R2. El valor 20 (línea azul), se considera el valor de intensidad que tiene *Lolium rigidum* de referencia sensible y 40 (línea roja), se considera el valor de intensidad que tiene *L. rigidum* de referencia resistente.

Según los desarrolladores del kit, los valores de la lectura para que se consideren poblaciones sensibles oscilan un valor de 20, y para que se considere resistente a herbicidas es de 40. Estos valores son los establecidos al utilizar el test LFD con *Lolium rigidum* australiano. Se observa como la única población que oscila los valores de lectura típica para una población sensible, de 20, es la población resistente R1.

La segunda prueba con el test LFD se dejó reaccionar más tiempo que la primera prueba a 5, 20 y 60 minutos de la aplicación de la muestra (gráfica 6). Se observa que hay diferencia de intensidad entre los tiempos, aumentando de la medida de los 5 a los 20 minutos y con pocas variaciones hasta los 60 minutos. A las poblaciones S1, R1 y R2 se le sumaron poblaciones sensibles (SLr) y resistentes a prosulfocarb (RLr) procedentes de Inglaterra, además de plantas de las poblaciones R1 y R2 que sobrevivieron a 1600 g ha<sup>-1</sup> de prosulfocarb.

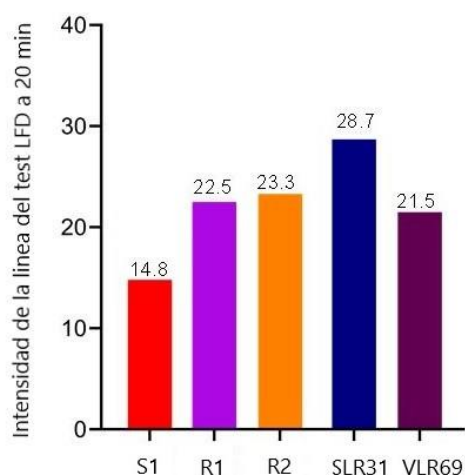


Gráfica 6. Segundo ensayo de determinación de la intensidad de la línea del test LFD a los tiempos de 5, 20 y 60 minutos desde la aplicación de la muestra en el LFD, de las poblaciones sensibles, resistentes y poblaciones resistentes con aplicación de prosulfocarb (+2). Intensidad media de 3 réplicas y la desviación estándar.

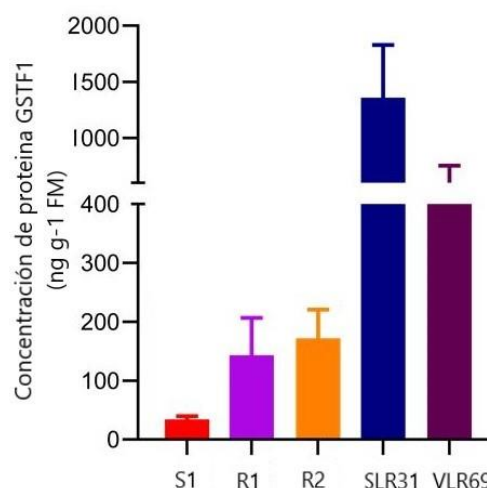
A los 5 minutos se observa cómo la población R2 con aplicación de 2 L de prosulfocarb  $\text{ha}^{-1}$  es la que muestra mayor intensidad con 8,2, mientras que todas las otras poblaciones con o sin tratamiento de prosulfocarb tienen una intensidad menor similar entre 3 y 4. S1 tiene la menor intensidad con 2,65. En las lecturas del minuto 20, la intensidad aumenta en todas las poblaciones. En todos los casos se observa mayor intensidad al ser tratadas con herbicida que al no tratadas. La población R2 con aplicación de 2 L de prosulfocarb  $\text{ha}^{-1}$  continúa siendo la más intensa con un valor medio de 14. Contrariamente, la población R2 sin tratamiento es la que presenta menor intensidad, con 6,4. La población sensible S1 es la que presenta menor intensidad con 8,2. A los 60 minutos no hay gran variación de las intensidades. Sí se da una mayor intensidad en la población R1 tratada, similar a R2 tratada, con 13,1 y 13,7 respectivamente, siendo los valores más altos.

Aun así, la intensidad de la banda del test LFD de la segunda prueba a los 20 minutos de reacción (tiempo al que realizaron los análisis en UK) fue analizada mediante análisis no paramétricos. El test Kruskal-Wallis, con población como único factor, dio un resultado de 0,9739, siendo no significativo, indicando que no hay diferencia entre las medias de las distintas poblaciones.

En la tercera prueba, las lecturas de la banda del test de cada población estudiada comparadas con las lecturas de las poblaciones con resistencia metabólica (SLR31 y VLR69), mostraron una menor intensidad en las poblaciones sensibles que en las resistentes, con un menor valor en S1 y el mayor en SLR31. Las poblaciones estudiadas R1 y R2 tienen intensidad similar, y mayor que S1 (gráfica 7).



Gráfica 7. Intensidad de la línea del test de la poblaciones de *L. rigidum* sensibles (S1) y resistentes (R1 y R2) comparado con la lectura de las poblaciones de referencia con resistencia metabólica (SLR31 y VLR69).



Gráfica 8. Niveles de la proteína LrGSTF1 de tejido de hoja de poblaciones de *L. rigidum* cuantificada mediante ELISA de la poblaciones de *L. rigidum* sensibles (S1) y resistentes (R1 y R2) comparado con la lectura de las poblaciones de referencia con resistencia metabólica (SLR31 y VLR69). Cada barra representa la concentración de proteína LrGSTF1 (media  $\pm$  DS,  $n = 5$ )

En cuanto a los niveles de proteína LrGSTF1 cuantificada por ELISA (gráfica 8), se observa una gran diferencia de concentración entre las poblaciones de referencia inglesas (SLR31 y VLR69) en comparación con las plantas de *Lolium* españolas (S1, R1 y R2). SLR31 y VLR69 presentan la mayor concentración, mayores de 400 ng g<sup>-1</sup> FM. Igualmente, R2 y R1, con valores alrededor de 150 ng g<sup>-1</sup> FM tienen mayor concentración que la población sensible S1, con un valor inferior a 50 ng g<sup>-1</sup> FM.

La intensidad de la banda del test del LFD corresponde con los niveles de proteína LrGSTF1 cuantificada por ELISA. Además, los niveles de proteína LrGSTF1 y de intensidad de la banda eran inferiores en poblaciones sensibles comparada con las resistentes.

## 5. Discusión

### 5.1. Reversión de las resistencias

El prosulfocarb es una de las pocas herramientas químicas que quedan disponibles que es eficaz contra *Lolium rigidum* resistente a herbicidas, y aunque la resistencia a éste todavía no es un problema generalizado en el campo, es importante prevenir cualquier posible pérdida de la eficacia de este herbicida (Dücker et al. 2019). Se conoce que en *L. rigidum*, diferentes insecticidas organofosforados o fungicidas probablemente interactúen y/o compitan con el sitio de unión de diferentes enzimas P450 o GST, respectivamente, involucradas en la resistencia metabólica y modulan la inhibición de diferentes procesos metabólicos involucrados en la degradación de diferentes herbicidas (Busi et al. 2017). Por eso, los estudios de la reversión química de resistencias, sobre todo con malatión y otros insecticidas similares, son ya antiguos (Preston et al. 1996) y usados habitualmente hoy en día para demostrar que el citocromo P450 está implicado en la respuesta resistente a herbicidas.

Solo hay dos estudios hasta la fecha que han demostrado claramente que se puede usar el NBD-Cl como inhibidor de la GST de forma positiva (sensibilizar plantas resistentes). Uno es el estudio de referencia, en el cual lo consiguieron, con más de un herbicida, para *A. myosuroides* con resistencia múltiple a varios modos de acción (Cummins et al. 2013). El otro es un reciente estudio con *Amaranthus palmeri* realizado en placa de Petri con herbicidas de pre-emergencia, donde se valoraba el efecto sobre la longitud de las raíces (Brabham et al. 2019). En nuestro caso, era de esperar que la aplicación de **NBD-Cl** fuera a ser efectivo en el sinergismo con el prosulfocarb. La enzima *LrGSTF1*, igual que *AmGSTF1*, contienen un residuo de cisteína conservado (Cys-120) que se modifica covalentemente tanto por NBD-Cl como por GSH, por lo tanto, era de esperar que la aplicación de NBD-Cl en *L. rigidum* revirtiese la resistencia metabólica. Aun así, en estos experimentos no se ha observado esta tendencia.

La eficacia de la aplicación de NBD-Cl en pre-emergencia (exp. B) no pudo determinarse con exactitud ya que la aplicación del herbicida en altas concentraciones produjo una gran mortalidad en plántulas tanto sensibles como resistentes. A dosis de 1200 g ha<sup>-1</sup> se observó mayor resistencia en R1 que R2, y, además, la aplicación juntamente con NBD-Cl aumentó la resistencia, lo que podría sugerir un sinergismo de NBD-Cl con prosulfocarb.

La reducción de peso en plantas resistentes no se esperaba tan elevada a dosis mayores de 1200 g ha<sup>-1</sup>. Esto pudo ser debido a una excesiva toxicidad en las plántulas causada por la metodología de experimentación al aplicar los químicos en placa de forma diluida, de esta forma, está más tiempo en contacto con la estructura de la semilla, mientras que aplicándolo en maceta con tierra se solidificaba y el contacto termina siendo menor. También influyó que estaban en estadios de desarrollo muy tempranos, semillas sin germinar, y no en semillas germinadas con radícula e hipocótilo (y a veces con algún cotiledón), siendo más susceptibles.

Al estudiar el efecto del NBD-Cl en post-emergencia (exp. A) se observó una baja supervivencia en la población R1 no tratada, cuando se esperaba un 100% de supervivencia en todas las poblaciones. Además, al aplicarse únicamente NBD-Cl aumentó aún más la mortalidad, pasando de un 60% de supervivencia a un 20%. La mortalidad al aplicar prosulfocarb fue total en todas las plantas, incluso en las poblaciones resistentes, por eso, no podemos interpretar cual es el efecto del NBD-Cl. Esta susceptibilidad de las poblaciones R1 y R2 podrían deberse a errores experimentales, ya que en los otros experimentos si se mostraban resistentes enfrente de prosulfocarb, independientemente de la actividad del NBD-Cl.



En cuanto a la reducción del peso fresco, la población sensible se mostró menos afectada por el prosulfocarb que las poblaciones resistentes a dosis de 1600 g ha<sup>-1</sup>, lo que no debería ser así y también hace cuestionar la eficacia del experimento. Se produjo una gran reducción de peso en las poblaciones R1 y R2, incluso a dosis bajas. El efecto del NBD-Cl no está claro en este experimento, ya que por lo general no modificó el peso fresco en comparación con solo la aplicación de prosulfocarb. El porcentaje de reducción de peso fresco se obtuvo a partir del peso del control no tratado. Si los pesos del control no fueron normales (muy grandes o muy pequeños) es posible que los valores obtenidos de la aplicación de herbicida, después de aplicar la fórmula, fueran raros.

Concluimos que los experimentos con NBD-Cl (A y B) tuvieron errores experimentales, ya que se obtuvieron resultados de los controles anormales. Respecto al efecto del inhibidor de la GST, el NBD-Cl, no se observó un beneficio claro en las poblaciones resistentes, no incrementando significativamente la mortalidad ni la reducción de peso fresco en aplicaciones de pre o post-emergencia. El inhibidor de GST, no tuvo un efecto de sinergismo en el prosulfocarb sugiriendo que (i) las GST pueden no estar implicadas en la degradación de prosulfocarb o (ii) la actividad de una GST específica no fue suprimida por el NBD-Cl.

Además del estudio de referencia (Cummins et al. 2013), hay otros estudios que han usado el NBD-Cl como inhibidor de la GST. Pero en todo ellos fue para concluir que la GST no estaba implicada en la respuesta por metabolismo mejorado, o los resultados no fueron concluyentes. Es decir, no consiguieron inhibir la GST, sinergizar con el herbicida, y sensibilizar las plantas resistentes. Por ejemplo, en una población de *Avena fatua* L. con resistencia múltiple se comprobó que el NBD-Cl no afectaba a la sensibilidad a la aplicación del herbicida fenoxaprop-P-ethyl (Burns et al. 2017). Para *Amaranthus tuberculatus* y aplicación del herbicida atrazina se observó que la supervivencia de un biotipo A se reducía más al aplicar la atrazina con NBD-Cl que no solo herbicida, en cambio, un biotipo B obtenía resultados contrarios, demostrando la ineficacia de NBD-Cl (Ma et al. 2016). También Shergill et al. (2018) estudió otro biotipo C de la misma especie con resistencia a seis modos de acción de herbicidas, donde la combinación de NBD-Cl con atrazina tampoco mejoró la reducción de biomasa. Estos acontecimientos podrían deberse a que las GSTs que metabolizan la atrazina en el biotipo B y C podrían no estar completamente inhibidas por NBD-Cl, indicando que existen mecanismos de resistencia al herbicida similar pero distintos entre ambos biotipos, o que la resistencia fuese conferida por otras GSTs y no las inhibidas por NBD-Cl. Esto podría estar ocurriendo con nuestras y otras poblaciones de *L. rigidum*.

El **malatión** actúa inhibiendo la reacción de hidroxilación del herbicida catalizada por el citocromo P450. La reacción se basa en la interacción específica con el herbicida, que puede variar entre diferentes moléculas herbicidas y diferentes plantas (Paporisch y Rubin 2017), y, por tanto, la eficacia del malatión puede depender del tipo de mala hierba en que se aplica y el herbicida con el que interacciona. En el experimento de aplicación de malatión en pre-emergencia se ve una clara resistencia en R1 y R2, y sensibilidad en S1 (exp. E). El efecto del malatión es antagonista con el prosulfocarb, incrementando el porcentaje de supervivencia de las plántulas de *Lolium* R1 y R2, excepto a dosis de 4000 g de prosulfocarb ha<sup>-1</sup> en R1, que la disminuye. Lo mismo ocurre al observar la reducción de peso fresco, donde parece que el malatión protege las plántulas de la reducción de peso que causa el prosulfocarb. En presencia de inhibidor de P450 el peso de las plántulas termina siendo superior al de las plantas con solo tratamiento de prosulfocarb, lo que significa que al aplicar malatión las plantas se desarrollan más que si solo se aplica herbicida.



Este efecto de antagonismo puede ser causado por a un efecto de protección de la planta, no afectando de forma negativa a la enzima P450. El prosulfocarb tiene que ser activado (oxidación a la forma sulfóxida activa) dentro de la planta para tener efecto herbicida, y esta activación es seguramente gracias al citocromo P450 (Fuerst et al. 1987, Busi 2014). Seguramente en estas condiciones experimentales se está inhibiendo la activación del herbicida por citocromo P450 con el malatión en pre-emergencia, y por eso las poblaciones resistentes se muestran aún más resistentes.

Al aplicar el inhibidor de P450, malatión, en post-emergencia (exp. C), se obtienen resultados de supervivencia muy interesantes, ya que en R1 y R2 en todas las dosis se observa una disminución del porcentaje de supervivencia y, por tanto, una mejora de la eficacia del herbicida prosulfocarb en presencia de malatión. Por ejemplo, a dosis de 1600 g ha<sup>-1</sup>, R1 llega a incrementar un 60% la mortalidad y en un 25% en R2. También se observa esta tendencia en el peso de la parte aérea de las plantas, reduciendo más el peso al aplicar malatión, indicando que el desarrollo de las hojas se atrofia y degenera más.

Estos resultados podrían indicar que el malatión sí esta interactuando con el citocromo P450, inhibiendo o compitiendo en la actividad enzimática, y por lo tanto, permitiendo un correcto funcionamiento del herbicida prosulfocarb sobre las malas hierbas en post-emergencia precoz.

Por el momento no se han identificado el gen o genes P450 específicos que otorgan resistencia metabólica de forma consistente en la mayoría de poblaciones de una especie o entre especies. Hay una necesidad de identificarlos, si es posible, tanto en *Lolium* sp. como en otras especies, para poder conocer su expresión génica sin herbicida o bajo situaciones de estrés por herbicida (Duhoux y Délye 2013). Conociendo su expresión y estructura, se podría diseñar un test como ha hecho la Universidad de Newcastle para la GST y poder detectar resistencias metabólicas de forma rápida en el campo.

Se observan claras diferencias de actuación con prosulfocarb del malatión y NBD-Cl. Se observan evidencias de que el malatión es el único que genera una reacción de sinergismo con el herbicida en plantas de *Lolium*. Éste revierte la resistencia a prosulfocarb de forma química impidiendo su detoxificación, inhibiendo la hidroxilación del prosulfocarb por parte de la P450. Por otro lado, NBD-Cl no da resultados claros y no se puede concluir que sea efectiva su aplicación. Aunque la enzima GST de *Lolium* tenga un 91% de similitud con la AmGST1 y el residuo de cisteína conservado que comparten no sea el aminoácido diana de la actuación de NBD-Cl para la reversión de la resistencia, no actúa como inhibidor de la LrGST1. Por otro lado, es probable que el malatión no sea efectivo o el NBD-Cl sí tenga un efecto sinérgico en la reversión de resistencia con otros herbicidas diferentes al prosulfocarb. Este sinergismo selectivo entre herbicidas puede ser debido a la diferencia estructural entre estos herbicidas (Tardif y Powles, 1999).

El malatión ha funcionado en los experimentos de post-emergencia, por tanto, se confirma una reacción específica del malatión con algún enzima citocromo P450 de *L. rigidum* combinado con prosulfocarb. En cambio, esta reacción no ha sido la misma en pre-emergencia, que ha resultado en una reacción antagonista generando aún más resistencia a prosulfocarb. Estos resultados no son inesperados porque el prosulfocarb es un protoherbicida y como tal, tiene ser activado dentro de la planta para que tenga actividad herbicida. Se sabe que esta activación es mediada por el citocromo P450 (Busi 2014). La hipótesis planteada es que el malatión inhibe en raíces el citocromo P450 responsable de la activación del prosulfocarb, por eso las poblaciones resistentes se mostraron aún más resistentes. Cuando el malatión es

aplicado en post-emergencia, el prosulfocarb sí que se activaría en raíces, sería translocado por xilema al resto de la planta, y en las hojas puede ser degradado por el citocromo P450, que sería bloqueado en presencia del inhibidor. Se piensa que en la población sensible las dosis de herbicida eran demasiado altas para ver también este efecto.

Tras la experimentación de malatión, NBD-Cl y prosulfocarb, observamos cierta variabilidad de resultados entre poblaciones resistentes R1 y R2. La población R1 fue más receptiva en la aplicación de malatión en post y hubo más sinergismo que en la población R2. En cambio, en pre, R2 fue más receptiva al malatión siendo más antagonista que R1. En cambio, no hubo diferencias en cuanto a poblaciones R1 y R2 en la aplicación de NBD-Cl. Esta variabilidad en los niveles de resistencia es habitual en malas hierbas y depende de varios factores (Yu y Powles 2014).

Tras los experimentos con NBD-Cl y malatión, otra hipótesis a estudiar sería si al aplicar ambos inhibidores conjuntamente, la reversión de resistente a sensible pudiese aumentar, explicando que tanto el citocromo P450 como la GST estarían involucrados. En uno de los pocos estudios disponibles en este sentido, en una población de *A. palmeri* con resistencia NTSR por P450 y GST al herbicida fomesafen, se trató con NBD-Cl y malatión seguida del fomesafen en pre-emergencia. Aun así, al mezclar los inhibidores no mostró ningún beneficio adicional en comparación con el tratamiento con un solo inhibidor (Varanasi et al., 2018).

## 5.2. Resistencia múltiple y cruzada

En cuanto a resistencia cruzada en *L. rigidum*, en estudios anteriores del grupo de investigación de Malherbología ha habido indicios de resistencias a herbicidas distintos en poblaciones de esta especie, e incluso resistencias a diversas familias de modos de acción distintas. Estudios previos con la poblaciones R1 y R2 confirmaron su resistencia múltiple a varios herbicidas, entre ellos el clortolurón y flufenacet, por el Servei de Protecció dels Vegetals de la Generalitat de Catalunya (Dr. Montull y Dr. Taberner, comunicación personal).

En los experimentos de este trabajo, R1 y R2 se mostraron resistentes a dosis bajas de 750 y 1500 g ha<sup>-1</sup>, habiendo plantas que sobreviven, en cambio, no hay superviviente a esta dosis de la población S1. Aun así, R1 y R2 acaban muriendo completamente a dosis de 2500. La resistencia no se observa tan acentuadamente al observar el porcentaje de reducción de peso, ya que a todas las dosis y en todas las poblaciones llegan aproximadamente al 100% de reducción de peso. Por tanto, experimentalmente R1 y R2 se calificarían de moderadamente resistentes, mientras que S1 es claramente sensible a clortolurón.

En los resultados de la supervivencia obtenidos, observamos como la población más sensible a la aplicación de flufenacet era S1. Las poblaciones R1 y R2 mostraron cierto grado de resistencia, siendo R2 la población más resistente, seguida de R1. A demás, estas tendencias también se observan en la reducción de peso fresco, donde S1 obtiene una mayor reducción de peso fresco, seguido de R1 y finalmente R2 con una menor reducción, significando tener una mayor resistencia a la aplicación del herbicida flufenacet. Según los estudios previos, ambas poblaciones R1 y R2 habían sido clasificadas como moderadamente resistentes, lo cual, hemos verificado con estos resultados obtenidos. A demás, no hay diferencias de mortalidad ni reducción de peso a diferentes dosis, con lo que la aplicación de flufenacet sería optima a dosis 120 g ha<sup>-1</sup>, evitando dosis excesivas e innecesarias.

En cuanto al herbicida propizamida, la población R2 es la única que se muestra significativamente resistente, mientras que S1 y R1 son sensibles. A dosis baja, de 375 g ha<sup>-1</sup>, la población R2 se muestra muy resistente (87,5% de supervivencia y solo el 46,3% de reducción de peso) y S1 y R2 muestran mortalidades muy elevadas (87,5 y 85% respectivamente) y altas reducciones de peso. A dosis más altas, S1 y R1 llegan a la completa mortalidad y la supervivencia de R2 llega al 37,5%, y todas las poblaciones, sin diferencias significativas entre ellas, se aproximan a la reducción del 100% del peso fresco. Por eso, lo óptimo para eliminar todas las poblaciones sería aplicar a 750 g/ha.

Tras los estudios, se observan mayores diferencias al observar el porcentaje de supervivencia que en el porcentaje de reducción de peso fresco. Se observa que la población S1 es sensible al clortolurón, flufenacet, propizamida, además, del prosulfocarb. La población R1 se muestra resistente al clortolurón y medianamente resistente a los herbicidas propizamida y flufenacet. Aun su resistencia, se llega a una mortalidad total a dosis de 1500 g ha<sup>-1</sup> en propizamida y de 2500 g ha<sup>-1</sup> de clortolurón, en cambio, con flufenacet no se consigue su erradicación a la dosis más alta utilizada. Por último, la población R2 se muestra significativamente más resistente que R1 a los herbicidas flufenacet y propizamida, y en igual medida al clortolurón, con el cual se llega a una mortalidad del 100% a dosis de 2500 g ha<sup>-1</sup>.

Las poblaciones de *L. rigidum* estudiadas fueron probablemente tratadas con diversos herbicidas de forma sucesiva durante muchos años de cultivo de cereal. Una secuencia habitual en el pasado fue aplicar primer con el grupo A (i.e. diclofop), cuando dejó de funcionar se empezó a aplicar clortolurón (grupo C2), que también dejó de funcionar, pasando a aplicar el grupo B, y cuando dejó de funcionar, se empezó finalmente con los tratamientos en pre-emergencia a base de prosulfocarb. Tras años reiterados de aplicación del mismo herbicida acabaron produciéndose resistencias a todos éstos. Se conoce que cada población resistente con resistencia metabólica es un evento evolutivo diferente, y es de esperar que las poblaciones difieran en el número de loci de genes que confieren resistencia, insinuando que la resistencia a los herbicidas metabólicos puede ser dotada por uno o varios loci de genes nucleares y a menudo desarrollando una resistencia poligénica (Délye 2013, Busi et al. 2011, 2013).

Conocemos que estas malas hierbas tienen resistencia múltiple y cruzadas debido a altas tasas de degradación de herbicidas de manera similar a como lo haría un cereal (Cummins et al. 2013). Por ejemplo, Yu y Powles (2014) observaron que la selección con el herbicida piroxasulfona, inhibidor de la síntesis de ácidos grasos de cadena muy larga (grupo K3), en *L. rigidum* resultó en resistencia cruzada a los herbicidas de tiocarbamato prosulfocarb y triallato (ambos grupo N), debido a que el P450 y / u otros genes del metabolismo responsables de la resistencia pueden metabolizar una gran variedad de estructuras químicas de herbicidas. Por eso, es posible que se pudiesen dar resistencias de la misma forma entre los herbicidas estudiados prosulfocarb, flufenacet, propizamida y clortolurón.

### 5.3. BReD kit

En los ensayos con el BReD kit, ninguna de las poblaciones llega a los valores de población resistente (40, según los creadores del kit), aunque conocemos experimentalmente que si se trata de poblaciones resistentes a herbicida. La población sensible ronda valores de 10 -15, mientras que las resistentes están entre los 15-25 (depende del experimento y la población), cuando deberían llegar a 20 y 40 respectivamente.

En el ensayo con la población de referencia *R<sub>Lr</sub>* y algunas poblaciones de *Lolium* con aplicación de prosulfocarb ( $2 \text{ L ha}^{-1}$ ) se observó una mayor intensidad del LFD en las poblaciones *R<sub>Lr</sub>* y *R<sub>2</sub>* tratadas con prosulfocarb. Ésto pudo deberse a una sobreexpresión de la enzima *LrGST1* inducida por el estrés causada por el herbicida. Además, como era de esperar, las poblaciones resistentes tienen más intensidad que la sensible *S1*.

La intensidad de la banda del test del *Lateral Flow Device* corresponde con los niveles de proteína *LrGSTF1* del ELISA. Como se utilizaron las mismas muestras de plantas en ambos experimentos, estos resultados confirman la exactitud del LFD para detectar la proteína *LrGSTF1* en poblaciones de *Lolium*, y los resultados obtenidos en los análisis 1 y 2 los aceptamos como válidos. Aun así, se observa que la relación entre intensidad y concentración de enzimas es más desproporcionada en las poblaciones de referencia resistentes *SLR31* y *VLR69*, respecto a las demás. Éstas tienen intensidades similares a las de *R1* y *R2* pero su concentración de proteína es más del doble que las poblaciones españolas. Esto puede deberse a que la intensidad del LFD se satura en algún punto, y deja de seguir una proporcionalidad lineal dada una elevada concentración de enzima.

También podría deberse a que, se podría considerar que la baja intensidad del LFD, podría ser debido a que como el BReD kit está diseñado para la detección de *AmGST1*, el funcionamiento del LFD no sea específico para la proteína *LrGST1*, y que, por tanto, su detección sea errónea. El homólogo de la proteína *AmGSTF1* se identificó en *L. rigidum* (*LrGSTF1*), la cual tiene una gran similitud en la secuencia de aminoácidos (91% similitud), aun así, la variación entre la estructura de enzimas puede estar localizada en el epítipo, el punto de unión de la proteína *AmGST1* con el anticuerpo específico de *AmGST1* de detección del kit (el epítipo).

Los niveles de la *LrGST1* en hoja de las poblaciones *R1* y *R2* fueron significativamente inferiores que en las poblaciones resistentes de referencia usadas. Ésto podría deberse a que, aunque sean plantas de la misma especie, han sufrido procesos de selección diferentes. Se conoce que las dos plantas de referencia sufren numerosas resistencias a una gran variedad de herbicidas y por tener un historial de aplicaciones de herbicidas muy extenso y diferente, lo que es posible que acumulen más de un gen de resistencia y su resistencia metabólica sea muy potente, lo que acabe dando una preocupante sobreexpresión de la proteína detoxificante de herbicidas GST. En cambio, las poblaciones de Calonge de Segarra podrían no han sufrido esta selección tan severa, y no acumulando tantas alteraciones, lo que acaba con una expresión menor de proteínas GST, o que haya diferentes GST involucradas además de la GST1 con la expresión alterada. También podría ser simplemente que pueda haber cierta variedad en la secuencia de aminoácidos de la GST entre poblaciones tan distantes de *L. rigidum*, como son Australia y España. Es conocida la gran variabilidad genética que tiene esta especie (Yu y Powles 2014), y que podría verse reflejada incluso en la *LrGST1*. Podría ser que la *LrGST1* de poblaciones españolas tenga un grado de homología inferior al 90% con la *AmGST1*.

En estudios futuros, para corroborar el rol de la *LrGST1* y otras, se deberían realizar tanto análisis del transcriptoma como del proteoma, obtener su secuencia completa y complementarla con la información de la concentración de proteína que conocemos en este trabajo.

## 6. Conclusiones

La conclusión general de este estudio es que las poblaciones R1 y R2 son resistentes al herbicida prosulfocarb, y que además, presentan cierta resistencia cruzada a otros herbicidas con modos de acción distintos a este. Además, se aportan indicios de que estas resistencias son debidas a la presencia de metabolismo aumentado como mecanismo, además de los posibles enzimas implicados.

Las conclusiones específicas que se pueden extraer de este estudio son las siguientes:

- ❖ Se corrobora que las poblaciones R1 y R2 son moderadamente resistentes al herbicida prosulfocarb, sobre todo a dosis bajas.
- ❖ Usando el NBD-Cl como inhibidor de la enzima glutatión-S-transferasa las plantas resistentes de las poblaciones R1 y R2 no se volvieron más sensibles al herbicida prosulfocarb aplicados en pre-emergencia. Se obtuvieron los mismos resultados usando el inhibidor NBD-Cl cuando el experimento se realizó en post-emergencia para ambas poblaciones.
- ❖ Por lo tanto, no se ha podido demostrar el rol de la glutatión-S-transferasa en la respuesta resistente por metabolismo a prosulfocarb usando el NBD-Cl como inhibidor.
- ❖ Usando el insecticida malatión en post-emergencia como inhibidor del citocromo P450, se sensibilizaron parcialmente las plantas resistentes tanto de la población R1 como R2.
- ❖ Por lo tanto, se confirma que el citocromo P450 contribuye a la respuesta resistente por metabolismo aumentado en ambas poblaciones.
- ❖ En cambio, cuando se usó el malatión en pre-emergencia, en las poblaciones resistentes ocurrió lo contrario, estas se volvieron parcialmente más resistentes.
- ❖ Se hipotetiza que mientras en pre-emergencia se inhibe el citocromo P450 responsable de activar el prosulfocarb en raíces, en post-emergencia (hojas) se inhibe el que puede degradarlo.
- ❖ En este experimento, las poblaciones R1 y R2 presentaron niveles bajos de resistencia cruzada y múltiple a otros herbicidas con distinto modo de acción al prosulfocarb (grupo N): clortolurón (grupo C2), flufenacet (grupo K3) y propizamida (grupo K1).
- ❖ Los niveles de la proteína LrGSTF1 de tejido de hoja cuantificada mediante ELISA de las poblaciones R1 y R2 fueron más elevados que en la población sensible.
- ❖ La intensidad de la banda del test del LFD (BReD kit) correspondió con los niveles de proteína LrGSTF1 cuantificada por ELISA. Los niveles de intensidad de la banda eran inferiores en la población sensible comparada con las dos resistentes.
- ❖ Por lo tanto, potencialmente se podría adaptar el uso del LFD (desarrollado para *Alopecurus*) para su uso en *Lolium rigidum* con resistencia múltiple y cruzada a varios herbicidas por metabolismo aumentado. Disponer de esta información sería clave en la toma de decisiones para racionalizar el uso de herbicidas.

## 7. Bibliografía

Bak, S., Beisson, F., Bishop, G., Hamberger, B., Hofer, R., Paquette, S., & Werck-Reichhart, D. (2011). Cytochromes p450. *The Arabidopsis Book*, 9, 144.

BOE Nº 223 del 15 de septiembre de 2012. Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre, por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios.

Brabham, C., Norsworthy, J., Houston, M., Varanasi, V., & Barber, T. (2019). Confirmation of S-metolachlor resistance in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Weed Technology*, 33(5), 720-726. <https://doi.org/10.1017/wet.2019.44>

Brunton, D.J., Boutsalis, P., Gill, G., and Preston, C. (2018) Resistance to Multiple PRE Herbicides in a Field-evolved Rigid Ryegrass (*Lolium rigidum*) Population. *Weed Science* <https://doi.org/10.1017/wsc.2018.31>

Brunton, D. J., Boutsalis, P., Gill, G., & Preston, C. (2019). Resistance to very-long-chain fatty-acid (VLCFA)-inhibiting herbicides in multiple field-selected rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) populations. *Weed Science*, 67(3), 267–272. <https://doi.org/10.1017/wsc.2018.93>

Burns, E. E., Keith, B. K., Refai, M. Y., Bothner, B., & Dyer, W. E. (2017). Proteomic and biochemical assays of glutathione-related proteins in susceptible and multiple herbicide resistant *Avena fatua* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 140, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.06.007>

Busi, R., Gaines, T. A., & Powles, S. (2017). Phorate can reverse P450 metabolism-based herbicide resistance in *Lolium rigidum*. *Pest Management Science*, 73(2), 410–417. <https://doi.org/10.1002/ps.4441>

Busi, R. (2014). Resistance to herbicides inhibiting the biosynthesis of very-long-chain fatty acids. *Pest Management Science*. John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/ps.3746>

Busi, R., Gaines, T. A., Walsh, M. J., & Powles, S. B. (2012). Understanding the potential for resistance evolution to the new herbicide pyroxasulfone: Field selection at high doses versus recurrent selection at low doses. *Weed Research*, 52(6), 489–499. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2012.00948.x>

Busi, R., Vila-Aiub, M. M., & Powles, S. B. (2011). Genetic control of a cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance mechanism in *Lolium rigidum*. *Heredity*, 106(5), 817–824. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.124>

Busi, R., Yu, Q., Barrett-Lennard, R., & Powles, S. (2008). Long distance pollen-mediated flow of herbicide resistance genes in *Lolium rigidum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(8), 1281–1290. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0862-8>

Comité para la Prevención de la Resistencia a Herbicidas (2015). Grupo de trabajo de la Sociedad Española de Malherbología (SEMh).

Carrera de la N., Villarroya M., Chueca M.C. & García-Baudín J.M. (1999) Evaluation of *Lolium rigidum* biotypes resistance to chlorsulfuron: useful parameters. Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference on Weeds. 153-158.

Cummins, I., Wortley, D. J., Sabbadin, F., He, Z., Coxon, C. R., Straker, H. E., ... Edwards, R. (2013). Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(15), 5812–5817. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221179110>

DIRECTIVE 2009/128/CE. Directive for sustainable use of pesticides. Official Journal of European Union 2009; L309, 71-86.

Díaz E., Gorrochategui A., (Noviembre 2005). Manejo de poblaciones de *Lolium rigidum* resistentes a herbicidas. Revista Phytoma. Número de Edición: 173

Dücker, R., Zöllner, P., Lümmer, P., Ries, S., Collavo, A., & Beffa, R. (2019). Glutathione transferase plays a major role in flufenacet resistance of ryegrass (*Lolium* spp.) field populations. Pest Management Science. <https://doi.org/10.1002/ps.5425>

Duhoux, A., & Délye, C. (2013). Reference Genes to Study Herbicide Stress Response in *Lolium* sp.: Up-Regulation of P450 Genes in Plants Resistant to Acetolactate-Synthase Inhibitors. PLoS ONE, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063576>

Fuerst, E. P. (1987). Understanding the Mode of Action of the Chloroacetamide and Thiocarbamate Herbicides. Weed Technology, 1(4), 270–277. <https://doi.org/10.1017/s0890037x00029729>

Ghanizadeh, H., & Harrington, K. C. (2017). Perspectives on non-target site mechanisms of herbicide resistance in weedy plant species using evolutionary physiology. AoB PLANTS, 9(5). <https://doi.org/10.1093/aobpla/plx035>

Glasgow J. L., Mojica E., Baker D. R., Tillis H., Gore N. L. and Kurtz P. J. (1987). SC-0574 a new selective herbicide for use in winter cereals. Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference – Weeds Brighton, 27-33

Heap IM (2019). International survey of herbicide-resistant weeds. <http://www.weedscience.org>

HRAC, Herbicide Resistance Action Committee (2019) <https://hracglobal.com/prevention-management/best-management-practices>, Accedido el 2 de septiembre de 2019

Letouzé, A., & Gasquez, J. (2003). Enhanced activity of several herbicide-degrading enzymes: A suggested mechanism responsible for multiple resistance in blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.). Agronomie, 23(7), 601–608. <https://doi.org/10.1051/agro:2003036>

Izquierdo, J., Recasens, J., Fernández-Quintanilla, C., & Gill, G. (2003). Effects of crop and weed densities on the interactions between barley and *Lolium rigidum* in several Mediterranean locations. Agronomie, 23(7), 529–536. <https://doi.org/10.1051/agro:2003028>

- Loureiro, I., Escorial, C., Hernández Plaza, E., González Andújar, J. L., & Chueca, M. C. (2017). Current status in herbicide resistance in *Lolium rigidum* in winter cereal fields in Spain: Evolution of resistance 12 years after. *Crop Protection*, 102, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.08.001>
- Ma, R., Evans, A. F., & Riechers, D. E. (2016). Differential responses to preemergence and postemergence atrazine in two atrazine-resistant waterhemp populations. *Agronomy Journal*, 108(3), 1196–1202. <https://doi.org/10.2134/agronj2015.0571>
- Marrs, K. A. (1996). The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), 127–158. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.127>
- Oerke, E. C. (2006, February). Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>
- Oliveira, M. C., Gaines, T. A., Dayan, F. E., Patterson, E. L., Jhala, A. J., & Knezevic, S. Z. (2018). Reversing resistance to tembotrione in an *Amaranthus tuberculatus* (var. *rudis*) population from Nebraska, USA with cytochrome P450 inhibitors. *Pest Management Science*, 74(10), 2296–2305. <https://doi.org/10.1002/ps.4697>
- Owen, M. J., Martinez, N. J., & Powles, S. B. (2014). Multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* (annual ryegrass) now dominates across the Western Australian grain belt. *Weed Research*, 54(3), 314–324. <https://doi.org/10.1111/wre.12068>
- Paporisch, A., & Rubin, B. (2017). Isoxadifen safening mechanism in sweet corn genotypes with differential response to P450-metabolized herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 138, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.02.002>
- Posthuma-Trumpie, G. A., Korf, J., & Van Amerongen, A. (2009). Lateral flow (immuno)assay: Its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(2), 569–582. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2287-2>
- Powles, S. B., & Yu, Q. (2010). Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 317–347. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112119>
- Prado Ruiz-Santaella, J.L. (2011). Mecanismos de resistencia a ureas-sustituidas, fops y glicinas en *Lolium rigidum*. Universidad de Córdoba. Tesis doctoral. 136p.
- Preston, C., Tardif, F. J., Christopher, J. T., & Powles, S. B. (1996). Multiple resistance to dissimilar herbicide chemistries in a biotype of *Lolium rigidum* due to enhanced activity of several herbicide degrading enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 54(2), 123–134. <https://doi.org/10.1006/pest.1996.0016>
- Recasens J., Riba F., Izquierdo J., Forn R. & Taberner A. (1996) Gramíneas infestantes de los cereales de invierno de Cataluña. *I.T.E.A.* 2, 116-130.
- Shergill, L. S., Bish, M. D., Jugulam, M., & Bradley, K. W. (2018). Molecular and physiological characterization of six-way resistance in an *Amaranthus tuberculatus* var. *rudis* biotype from Missouri. *Pest Management Science*, 74(12), 2688–2698. <https://doi.org/10.1002/ps.5082>



Taberner A. (1996) Biología de *Lolium rigidum* Gaud. Como planta infestante del cultivo de cebada. Aplicación al establecimiento de métodos de control. Tesis Doctoral. Universitat de Lleida. España.

Tardif, F. J., & Powles, S. B. (1999). Effect of malathion on resistance to soil-applied herbicides in a population of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). Weed Science, 47(3), 258–261. <https://doi.org/10.1017/s0043174500091748>

Varanasi, V. K., Brabham, C., & Norsworthy, J. K. (2018). Confirmation and Characterization of Non-target site Resistance to Fomesafen in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). Weed Science, 66(6), 702–709. <https://doi.org/10.1017/wsc.2018.60>

Vencill WK (2002) “Herbicide Handbook,” 8th Edition, Weed Science Society of America, Lawrence, KS, USA

Xu, J., Wang, X. Y., & Guo, W. Z. (2015, September 1). The cytochrome P450 superfamily: Key players in plant development and defense. Journal of Integrative Agriculture. Chinese Academy of Agricultural Sciences. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60980-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60980-1)

Yu, Q., & Powles, S. (2014). Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: A threat to herbicide sustainability and global crop production. Plant Physiology, 166(3), 1106–1118. <https://doi.org/10.1104/pp.114.242750>

Zadoks, J. C., Chang, T. T., & Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Research, 14(6), 415–421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x>

## 8. Anexo

### Anexo 1. Secuencia nucleotídica de la GST de *Lolium rigidum*

>ENA|HF548530|HF548530.1 *Lolium rigidum* mRNA for glutathione transferase (GST gene):

Location:1..660

```
ATGGCGCCGGTGAAGGTGTTTGGGCGGCGATGTCGACAAACGTGGCGCGGGTGCTGGTC
TTCCTGGAGGAGGTGCGCGCCGACTACGAGGTGGTCGACATGGAAGTCAAGGTCATGGAG
CACAAGAGCCCCGAGCACCTCGCCAGAAACCCGTTTCGGCCAAATCCCTGCGTTCCAGGAT
GGGGATCTGCTTCTCTTTGAGTCACGCGCCATCTCCAAGTACGTCTCCGCAAGTACAAG
ACGGGCGAGGTGACCTGCTAAGGGAGGGCAACCTGAAGGAGGCGGCCATGGTGGACGTG
TGGACGGAGGTGGACGCGCACACCTACAACCCAGCCCTCTCCCCATCGTGTACCAATGC
CTCTTCAACCCCATGATGCGCGGCATCCCCACCGACGAGAAGGTCGTGGCCGAGAGCCTC
GAGAAGCTCAAGAAGGTGCTGGAGGTGTACGAGGCTCGCTCTCCAGCACGAGTACCTG
GCCGGGGATTTCGTGAGCTTCGCGGACCTCAACCACTTCCCTACACCTTCTACTTCATG
GCGACACCGCACGCGGCGCTATTCGGCTCGTACCCGCACGTCAAGGCCTGGTGGGAGAGG
ATCATGGCCAGGCCGCGCCATCAAGAAGATCAGCGCCACCATGGTTCCGCCAAAGGCTTGA
```

### Anexo 2. Secuencia aminoacídica de la GST de *Lolium rigidum*

```
/translation="MAPVKVFGPAMSTNVARVLVFLFEEVGADYEVVDMDFKVMHKSPEHLARNPFGQIP
AFQDGDLLLFESRAISKYVLRKYKTGEVDLLREGNLKEAMVDVWTEVDAHTYNPALSPIVYQCLFNPM
RGIPTDEKVVAESLEKLKKVLEVEARLSQHEYLAGDFVSFADLNHFPYTFYFMATPHAALFGSYPHVKA
WVERIMARPAIKKISATMVPPKA"
```

### Anexo 3. Análisis estadísticos

#### Anexo 3.1. Porcentaje de supervivencia en la aplicación de post-emergencia de prosulfocarb y NBD-Cl en las poblaciones sensible S, y resistentes R1 y R2.

	NBD-Cl	Análisis de poblaciones S y R				Análisis de poblaciones R	
		Sensible	Resistente	Resistente		Resistente	Resistente
		S1 A	R1 B	R2 A		R1 B	R2 A
0 g ha <sup>-1</sup> A	-	100±0 a	60±54,8 b	90±22,4 ab		60±54,8 b	90±22,4 a
	+	100±0 a	20±44,7 c	80±44,7 ab		20±44,7 c	80±44,7 ab
1600 g ha <sup>-1</sup> B	-	0±0 c	0±0 c	0±0 c		0±0 c	0±0 c
	+	0±0 c	0±0 c	0±0 c		0±0 c	0±0 c
3200 g ha <sup>-1</sup> B	-					0±0 c	0±0 c
	+					0±0 c	0±0 c
6400 g ha <sup>-1</sup> B	-					0±0 c	0±0 c
	+					0±0 c	0±0 c
		ANOVA	<,0001*			ANOVA	<,0001*
		Población	0,0012*			Población	0,0264*
		NBD-Cl	0,2029			NBD-Cl	0,2112
		Dosis	<,0001*			Dosis	<,0001*
		Pob* NBD-Cl	0,4268			Pob* NBD-Cl	0,4514
		Población *Dosis	0,0012*			Población *Dosis	0,0024*
		NBD-Cl * Dosis	0,2029			NBD-Cl * Dosis	0,1879
		Pob*NBD-Cl* Dosi	0,4268			Pob*NBD-Cl* Dosi	0,6225

*Anexo 3.2. Porcentaje de reducción del peso fresco de la parte aérea en la aplicación de post-emergencia de prosulfocarb y NBD-Cl en las poblaciones sensible S, y resistentes R1 y R2.*

Dosis herbicida	NBD-Cl	Análisis de poblaciones S y R						Análisis de poblaciones R			
		Sensible		Resistente		Resistente		Resistente		Resistente	
		S1	B	R1	A	R2	A	R1	A	R2	A
1600 g ha <sup>-1</sup> A	-	33,97±29,3	c	80,4±6,5	ab	94±3,8	a	80,4±6,5	c	94±3,8	a
	+	65,3±24,5	b	92,1±4,2	a	91,3±8,3	a	92,1±4,2	ab	91,3±8,3	ab
3200 g ha <sup>-1</sup> A	-							93,6±4,1	ab	93,9±3,9	a
	+							91,4±2,6	ab	86,6±7,3	bc
6400 g ha <sup>-1</sup> A	-							93,6±5,96	a	92±4,96	ab
	+							95±1,9	a	92,6±2,7	ab
		ANOVA		<,0001*		ANOVA		0,0213*			
		Población		<,0001*		Población		0,5876			
		NBD-Cl		0,0378*		NBD-Cl		0,8008			
		Población* NBD-Cl		0,0906		Dosis		0,2219			
						Pob* NBD-Cl		0,0453*			
						Población *Dosis		0,0201*			
						NBD-Cl * Dosis		0,0534			
						Pob*NBD-Cl* Dosi		0,2025			

*Anexo 3.3. Análisis de la varianza de Experimento D*

Clortolurón			
Supervivencia		Peso fresco	
ANOVA	<,0001*	ANOVA	0,2920
Población	0,0829	Población	0,2139
Dosis	<,0001*	Dosis	0,2196
Población*Dosis	0,4621	Población*Dosis	0,5434
Flufenacet			
Supervivencia		Peso fresco	
ANOVA	<,0001*	ANOVA	0,1461
Población	0,0054*	Población	0,0761
Dosis	<,0001*	Dosis	0,0904
Población*Dosis	0,4851	Población*Dosis	0,8374
Propizamida			
Supervivencia		Peso fresco	
ANOVA	<,0001*	ANOVA	0,0007*
Población	<,0001*	Población	0,0004*
Dosis	<,0001*	Dosis	0,0061*
Población*Dosis	0,0113*	Población*Dosis	0,1865

Anexo 4. Fotografías de los experimentos


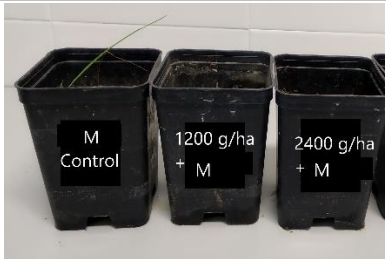


Anexo 4.1. Fotografías del experimento PRE NBD-Cl (B) con plantas de *Lolium rigidum* de las poblaciones S1, R1 y R2 tratadas en pre-emergencia con prosulfocarb (dosis indicada en g/ha) y con NBD-Cl y sin tratamiento de herbicida (control).

	S1
	R1
	R2

Anexo 4.2. Fotografías del experimento POST NBD-Cl (A) con plantas de *Lolium rigidum* de las poblaciones S1, R1 y R2 tratadas en post-emergencia con prosulfocarb (dosis indicada en g/ha) y con NBD-Cl y sin tratamiento de herbicida (control).

		S1
		R1
		R2

Anexo 4.3. Fotografías del experimento PRE Malatión (B) con plantas de *Lolium rigidum* de las poblaciones S1, R1 y R2 tratadas en pre-emergencia con prosulfocarb (dosis indicada en g/ha) y con Malatión (M) y sin tratamiento de herbicida (control).

		S1
		R1
		R2

## 9. Agradecimientos

Me gustaría agradecer especialmente al Dr. Joel Torra por haberme presentado este maravilloso proyecto, por haberme enseñado tanto sobre malas hierbas y el uso responsable de los herbicidas, por haberme ayudado siempre que lo necesitaba tanto en el invernadero como con la estadística de resultados y por su gran paciencia conmigo.

También agradecer al Dr. Jordi Recasens por haberme abierto las puertas al grupo de investigación de Malherbología y Ecología Vegetal en la Universitat de Lleida, y haberme dado la oportunidad de aprender tantas cosas sobre el extenso mundo de la malherbología.

Agradecer al resto del grupo de investigadores, doctorandos y estudiantes, Aritz, Carlos, Fran, Noemí e Irene por haber creado tan buen ambiente en el grupo y haberme permitido sentirme tan integrada. También por su gran ayuda y consejos durante los experimentos que me han facilitado muchísimo llevar a cabo el proyecto de investigación

También, teniendo en cuenta mi desconocimiento total inicial del mundo de la agricultura (ya que provengo del grado de biotecnología) me gustaría agradecer a la resta de profesores del máster, que con su dedicación y paciencia me han enseñado tanto sobre distintos aspectos de la agricultura sostenible, y que indirectamente me han permitido tener una visión más amplia de los resultados y haberme facilitado integrar todos los conocimientos adquiridos en el departamento.

Por último, agradecerles a todos los amigos que han llegado en Lleida y buenos compañeros de máster por haber creado tan buenos e inolvidables momentos, y a mi familia por haberme apoyado durante este año de duro trabajo, y que por fin se está concluyendo.